



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSTGRADO

**Inmunomodulación de macrófagos por
dos compuestos aislados de *Schkuhria
pinnata*, contra *Leishmania infantum***

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

MATOS ECHEVARRÍA, DANIEL ERNESTO

LIMA – PERÚ

2018

ASESORA

PhD. Valerie Jullian

Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD-FRANCIA)

CO ASESORA

PhD. Vanessa Adui Sichei

Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH)

JURADO DE TESIS

DR. MIRKO ZIMIC PERALTA

PRESIDENTE

DR. DANIEL CLARK LEZA

VOCAL

DRA. KATHERINE JESSICA TORRES FAJARDO

SECRETARIO (A)

DEDICATORIA

Dedicado a todo aquel que se sienta identificado con este proyecto, a todo aquel que sienta haber aportado en su realización y a todo aquel que haya creído que esto iba a ser posible y siga creyendo en todo lo que vendrá en un futuro.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas aquellas personas que directa o indirectamente me ayudaron con este trabajo. A aquellas que estuvieron en las buenas o en las malas. A aquellas que me acompañaron en cada parte de esta travesía, tanto a las que continúan haciéndolo como a las que lo hicieron en su día. Gracias a todos, gracias por todo.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Agradecimiento especial al FONDECYT, Convenio 031-2015-FONDECYT, por proporcionar los fondos para la presente investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN

PALABRAS CLAVE

ABSTRACT

KEY WORDS

I.	INTRODUCCIÓN.....	1-3
II.	PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	4-27
	II.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5-6
	II.2. MARCO TEÓRICO.....	7-25
	II.3. JUSTIFICACIÓN.....	26
	II.4. OBJETIVOS.....	27
III.	METODOLOGÍA.....	28-47
	III.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	29
	III.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	30
	III.3. FLUJOGRAMA DE TRABAJO.....	31
	III.4. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS.....	31-45
	III.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	46
	III.6. PLAN DE ANÁLISIS.....	46

IV.	RESULTADOS.....	47-67
V.	DISCUSIÓN.....	68-81
	V.1.OBTENCIÓN DE COMPUESTOS.....	69-71
	V.2.PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	72-81
VI.	CONCLUSIONES.....	82-83
VII.	RECOMENDACIONES.....	84-85
VIII.	LIMITACIONES.....	86-88
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89-104
X.	ANEXOS	
	X.1.ANEXO 1	
	X.2.ANEXO 2	
	X.3.ANEXO 3	

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
DBD	Dominio de unión a ADN
DCM	Diclorometano
<i>Cd36</i>	Gen codificante para CD36
cDNA	ADN complementario
<i>Clec7a</i>	Gen codificante para Dectina-1
C _q	Ciclo de cuantificación
CR	Cantidad relativa
CRN	Cantidad relativa normalizada
EP	Éter de petróleo
EtOAc	Acetato de etilo
ESI	Ionización por electrospray
FC	<i>Fold Change</i>
FN	Factor de normalización
gp63	Glicoproteína 63
Hex	Hexano
HPLC	Cromatografía líquida a alta presión
HPRT	hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa
<i>Hprt</i>	Gen codificante para HPRT
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50%

IRD	Instituto de Investigación para el Desarrollo
LBD	Dominio de unión de ligando
LC	Leishmaniasis cutánea
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LM	Leishmaniasis mucosa
LV	Leishmaniasis visceral
MeOH	Metanol
MPR	Macrófagos peritoneales de ratón
MPLC	Cromatografía líquida a mediana presión
MR	Receptor de manosa
<i>Mrc1</i>	Gen codificante para MR
MS	Espectrometría de masas
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PMA	Forbol 12-misristato 14-acetato
PPAR γ	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ
PPRE	Elemento de respuesta de PPAR
<i>PfPE</i>	Eritrocitos infectados con <i>Plasmodium falciparum</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
RMN	Resonancia magnética nuclear
RXR	Receptor X retinoide
SDS	Dodecil sulfato de sodio

SKI	Schkuhrin I
SKII	Schkuhrin II
SPE	Extracción en fase sólida
TLC	Cromatografía de capa delgada
UPCH	Universidad Peruana Cayetano Heredia

RESUMEN

En la búsqueda de drogas que potencien la respuesta inmunitaria contra el parásito *Leishmania*, se evaluaron dos lactonas sesquiterpénicas (SKI y SKII), aisladas de la planta *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze. Dichos compuestos podrían ser capaces de unirse al receptor nuclear PPAR γ y modificar la expresión de ciertos receptores en la membrana celular de los macrófagos (CD36, MR y Dectina-1), favoreciendo así su actividad microbicida.

En el presente trabajo se evaluó, luego del tratamiento de macrófagos peritoneales de ratón con los compuestos, la expresión génica de los receptores mencionados, la producción de superóxido y la fagocitosis de *L. infantum* por los macrófagos. Se encontró que los dos compuestos redujeron la expresión del gen *Mrc1* y favorecieron la expresión del gen *Cd36*, mientras que no modificaron la expresión del gen *Clec7a*. Por otro lado, los compuestos SKI y SKII no alteraron la fagocitosis ni la producción de superóxido producido por los macrófagos. En consecuencia, no se logró encontrar un efecto inmunomodulador frente a *Leishmania* por parte de ambos compuestos. Tomando en cuenta la sobreexpresión del gen *Cd36* y el demostrado involucramiento de CD36 en la fagocitosis de eritrocitos infectados por *Plasmodium falciparum* por parte de los macrófagos, se sugiere la evaluación del efecto inmunomodulador de SKII frente a *Plasmodium*.

Palabras clave: INMUNOMODULACIÓN, MACRÓFAGOS, SCHKUHRIN, LEISHMANIA, LEISHMANIASIS.

ABSTRACT

Two sesquiterpene lactones (SKI and SKII) isolated from the plant *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze were evaluated in the search for drugs that enhance the immune response against the parasite *Leishmania*. These compounds could be able to bind the nuclear receptor PPAR γ and modify the expression of certain receptors in the cell membrane of macrophages (CD36, MR and Dectin-1), thus favoring their microbicidal activity.

The present study evaluated, after the treatment of mouse peritoneal macrophages with the compounds, the gene expression of the above-mentioned receptors, the production of superoxide and phagocytosis of *L. infantum* by the macrophages. It was found that the two compounds reduced the expression of the *Mrc1* gene and favored the expression of the *Cd36* gene, while they did not modify the expression of the *Clec7a* gene. On the other hand, SKI and SKII compounds did not alter neither the phagocytosis nor the production of superoxide produced by macrophages. Consequently, no immunomodulatory effect against *Leishmania* was found for both compounds. Taking into account the overexpression of the *Cd36* gene and the demonstrated involvement of CD36 in the phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by macrophages, the evaluation of SKII's immunomodulatory effect against *Plasmodium* is suggested.

KEY WORDS: IMMUNOMODULATION, MACROPHAGES, SCHKUHRIN, *LEISHMANIA*, LEISHMANIASIS.

I. INTRODUCCIÓN

Los macrófagos son células del sistema inmunitario capaces de realizar el proceso de fagocitosis con el fin de hacer frente a cuerpos extraños que pueden resultar patogénicos para el hospedero. El reconocimiento de patógenos se realiza mediante la interacción de moléculas denominadas “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMP) –encontradas en los agentes patógenos– y receptores de reconocimiento de patrones (PRR) presentes en la membrana del macrófago.

Previamente, se ha reportado que la expresión de ciertos receptores en la superficie de los macrófagos puede ser potenciada mediante la activación del receptor nuclear PPAR γ , el cual es activado por la unión de ligandos activadores a su dominio de unión de ligando (LBD). Entre los diversos tipos de ligandos activadores de PPAR γ se encuentran las lactonas sesquiterpénicas, que pueden ser aisladas de productos naturales (plantas). Dichos compuestos poseen en su estructura motivos electrófilos conocidos como “aceptores de Michael”, con los cuales son capaces de unirse a cisteínas ubicadas en el LBD de PPAR γ y en consecuencia potenciar o reprimir la expresión de ciertos receptores en la membrana celular de los macrófagos (CD36, receptor de manosa (MR) y Dectina-1), favoreciendo así la interacción con el patógeno.

La planta *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze, popularmente conocida con el nombre de “canchalagua”, crece en el Perú y es usada tradicionalmente como planta medicinal con diversas propiedades como antiinflamatoria, antimicrobiana, antimalárica, etc. A partir de esta planta se han aislado dos lactonas sesquiterpénicas: schkuhrin I y schkuhrin II en cuya estructura presentan aceptores de Michael.

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Leishmania*; el cuadro visceral causado por *L. infantum* puede llegar a ser mortal. Dichos parásitos son capaces de alojarse y sobrevivir dentro de los macrófagos del hospedero vertebrado habiendo escapado previamente del ataque del complemento gracias a PAMPs como lipofosfoglicanos y gp63 presentes en su membrana. Al ser los macrófagos la primera línea de defensa del organismo para la lucha contra estos parásitos, es interesante la búsqueda de alguna droga que potencie su capacidad de hacerles frente.

En base a la estructura química de SKI y SKII, el objetivo de esta investigación fue explorar la posible actividad inmunomoduladora de ambos compuestos sobre macrófagos peritoneales de ratón, lo cual se espera mejore su capacidad microbicida contra los parásitos de *Leishmania infantum*.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios tripanosomátidos del género *Leishmania*. Dichos parásitos son transmitidos por las hembras de dípteros (de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*) conocidos como flebótomos, que actúan como vectores de la enfermedad. Los cuadros clínicos observados en esta enfermedad pueden dividirse principalmente en tres: leishmaniasis visceral (LV), leishmaniasis cutánea (LC) y leishmaniasis mucosa (LM); de las cuales la primera puede llegar a ser mortal si se deja sin tratamiento (Chappuis et al., 2007), por lo que es especialmente necesaria una atención hacia ella.

Son conocidas hasta 20 especies de *Leishmania* que son causantes de esta enfermedad en los humanos, y los síntomas varían según la especie infectante del parásito y la respuesta inmunitaria del paciente. Las especies causantes de LV son *L. donovani* (en África del Este e India) y *L. infantum* en Europa, África del Norte y América Latina (Chappuis et al., 2007).

Los medicamentos más usados actualmente para el tratamiento de esta enfermedad son los antimoniales pentavalentes y la anfotericina B, pero el uso de éstos involucra efectos tóxicos colaterales, además de ser tratamientos largos y costosos, y de administración parenteral (Davis, Murray, & Handman, 2004). La enfermedad afecta principalmente a las poblaciones pobres que no tienen recursos para acceder a dichos tratamientos. Por todo lo mencionado, se ve que es necesaria la búsqueda

de nuevos fármacos menos dañinos, más eficientes y con potencial para el tratamiento de dicha enfermedad.

Considerando que los tratamientos existentes, los cuales se enfocan en atacar directamente al parásito, son efectivos pero a la vez, como se mencionó, pueden llegar a ser dañinos para el paciente; en el presente trabajo se plantea explorar alternativas que se enfocan principalmente en mejorar la inmunidad del paciente y que de esta forma sea su propio organismo el que pueda hacer frente a los parásitos causantes de la leishmaniasis.

Al ser los macrófagos la primera línea de defensa del organismo para la lucha contra estos parásitos, es interesante la búsqueda de alguna droga con potencial de mejorar su capacidad para hacerles frente.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Participación de macrófagos en la respuesta inmunitaria contra patógenos

La inmunidad innata es un mecanismo de protección de los vertebrados frente a invasiones de agentes externos, por ejemplo diferentes tipos de microorganismos. En ella participan células especializadas que están preparadas para hacer frente a los patógenos incluso antes de la infección y que son capaces de diferenciar perfectamente lo propio de lo ajeno. Entre todas estas células se encuentran los macrófagos, los cuales son capaces de reconocer microorganismos patogénicos, fagocitarlos, degradarlos y así obstaculizar y/o impedir alguna infección. Los macrófagos también juegan un rol importante en la inmunidad adaptativa, gracias a que son capaces de presentar antígenos obtenidos de los microorganismos degradados a linfocitos T para su reconocimiento y posterior desarrollo de inmunidad específica contra estos (Kuby, Goldsby, Thomas, & Osborne 2007).

Para poder reconocer a los patógenos, los macrófagos poseen en su membrana diversos receptores entre los que se encuentran aquellos conocidos como PRR; útiles para el reconocimiento de PAMP. Los PAMPs son estructuras moleculares muy conservadas de distinta naturaleza, ubicadas en la membrana de los microorganismos patógenos pero no en las células humanas (Rojas M. et al., 2012). Una vez que el patógeno es fagocitado, este permanece en el fagosoma formado. Luego estas vesículas se fusionan con orgánulos que contienen enzimas

hidrolíticas llamados lisosomas, formando así los fagolisosomas, donde será finalmente digerido el patógeno fagocitado. Adicionalmente, en el fagolisosoma se forman moléculas reactivas a partir de oxígeno y nitrógeno, denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS); las cuales ayudan en la eliminación del agente externo fagocitado (Rojas M. et al., 2012).

2.2.2. Formación de especies reactivas de oxígeno en el macrófago

El oxígeno molecular se encuentra en el ambiente, bajo condiciones normales, en su estado de más baja energía, en el cual sus dos electrones más externos ocupan ambos orbitales pi antienlazantes (π^*) y sus espines (del inglés *spin*) se encuentran paralelos (Figura 1). En este estado es conocido como oxígeno triplete. Para que se pueda dar una reacción con el oxígeno en dicho estado es necesario que el átomo o molécula con el que vaya a reaccionar presente también electrones con espines paralelos, lo cual no es común, por lo que esta forma del oxígeno no es muy reactiva. Sin embargo, la molécula de oxígeno puede pasar a ser reactiva por medio de una ganancia de energía que permita que los espines de ambos electrones externos se encuentren antiparalelos, este estado es conocido como oxígeno singulete. Biológicamente el oxígeno también puede pasar a un “estado reactivo” luego de reducirse y convertirse en un ion-radical superóxido (Apel & Hirt, 2004; Klotz, 2002). La reacción de reducción mencionada puede llevarse a cabo dentro de los macrófagos gracias a una

enzima FAD-dependiente, llamada NADPH oxidasa, que transfiere los electrones del NADPH al oxígeno (Babior, 1984). El ion superóxido formado puede, posteriormente, dismutar por la acción de una enzima llamada superóxido dismutasa para así generar peróxido de hidrógeno; o reaccionar con monóxido de nitrógeno para generar el ion peroxinitrito (Figura 1).

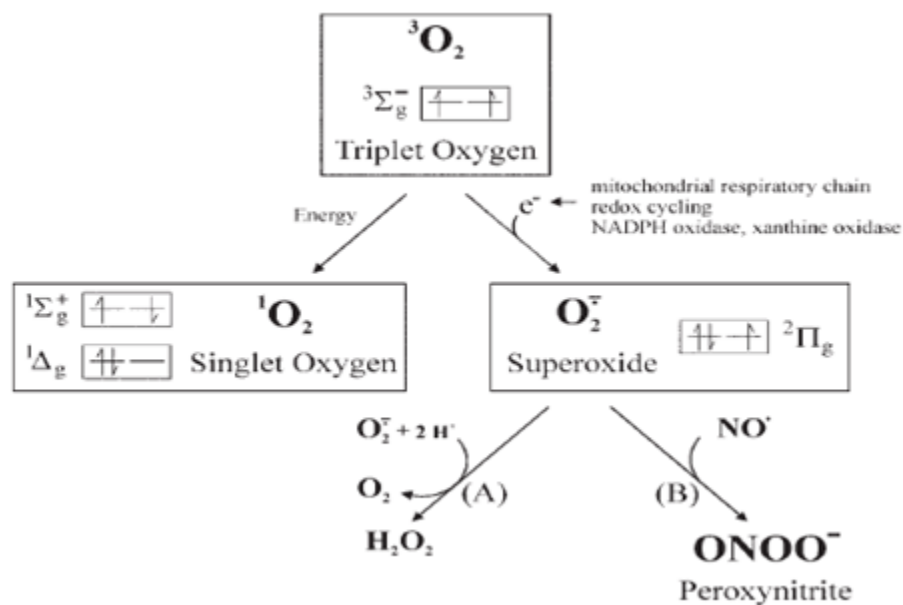


Figura 1. Formación de especies reactivas de oxígeno a partir de oxígeno molecular en estado triplete. Se observa una representación de los últimos orbitales moleculares ocupados del oxígeno triplete (${}^3\Sigma_g^-$), singlete (${}^1\Sigma_g^+$ y ${}^1\Delta_g$) y superóxido (${}^2\Pi_g$). Para el oxígeno singlete se observan las dos posibles formas en las que los electrones pueden acomodarse con espín antiparalelo. (A) Dismutación del superóxido por la enzima superóxido dismutasa. (B) Reacción del superóxido con monóxido de nitrógeno para formar el ion peroxinitrito (Klotz, 2002).

2.2.3. PPAR γ : estructura, función y su posible rol en la inmunomodulación

El PPAR γ es un receptor nuclear tipo II que se encuentra libre (no anclado a la membrana) y en un estado “inactivo” dentro del núcleo de la célula. Funciona como factor de transcripción regulando la expresión de diversos genes. Para que se pueda iniciar un proceso de transcripción en el cual PPAR γ está involucrado es necesaria su activación por unión de ligandos activadores. Dicha unión ocasiona un cambio conformacional del PPAR γ . Pueden ser identificados tres dominios en la estructura de este factor de transcripción, éstos son: un dominio N-terminal que está relacionado con su regulación, un dominio central de unión a ADN (DBD) y un dominio C-terminal de unión de ligando (LBD) (Itoh et al., 2008; Puhl et al., 2012). El LBD está conformado por 13 hélices- α (y una pequeña hoja- β), de las cuales la hélice 12 y el loop entre las hélices 2 y 3 son las partes más móviles de éste (Nolte et al., 1998). Una vez que el ligando se une a dicho dominio, ocurre un cambio conformacional que lo vuelve más rígido y permite el reclutamiento de coactivadores (De Groot et al., 2013). El LBD presenta una cavidad larga en forma de “Y” (figura 2) lo cual permite, tomando además en cuenta la flexibilidad del dominio, que PPAR γ interaccione con varios ligandos estructuralmente distintos (Itoh et al., 2008).

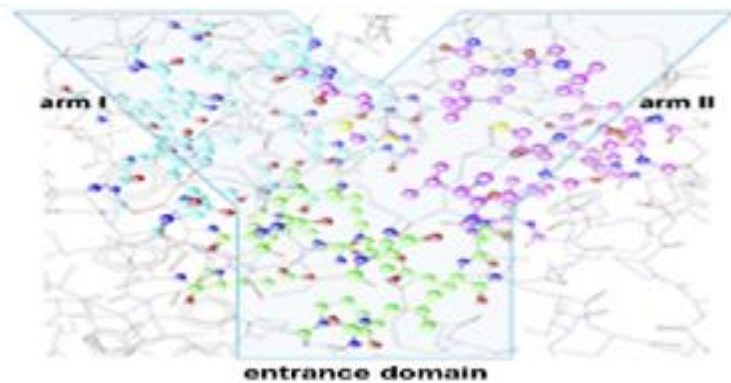


Figura 2. Dominio de unión de ligando del PPAR γ . Presenta un dominio de entrada (resaltado en color verde), y dos brazos, arm I (en color celeste) y arm II (en color rosado) (Wang et al., 2014).

El receptor nuclear PPAR γ (única isoforma presente en macrófagos) es un factor de transcripción muy conocido por estar involucrado en la diferenciación de adipocitos, en el metabolismo de lípidos en éstos, por promover la sensibilidad a insulina, mejorar la captación y exportación de lípidos por los macrófagos, y poseer efectos antiinflamatorios (Lehrke & Lazar, 2005). También se sabe que modula la proliferación y la apoptosis de varios tipos de células cancerígenas (Han & Roman, 2007; Reka et al., 2010).

Este factor de transcripción puede ser encontrado en el núcleo de células de varios tejidos y órganos como tejido adiposo, corazón, intestinos delgado y grueso, colon, riñón, páncreas, bazo y músculo esquelético; también está presente en células del sistema inmunitario tales como

macrófagos y células dendríticas (Willson, Brown, Sternbach, & Henke, 2000).

Luego de un cambio conformacional de PPAR γ , debido a la unión de un ligando al LBD, éste se une a otro receptor nuclear activado por ligando llamado receptor X retinoide (RXR), formando un heterodímero que es capaz de unirse al ADN en una región con secuencia específica ubicada dentro del promotor del gen a activar, conocida como elemento de respuesta de PPAR (PPRE) (Gearing, Göttlicher, Teboul, Widmark, & Gustafsson, 1993; Lemberger, Desvergne, & Wahli, 1996; Yu & Reddy, 2007). Dicho elemento se encuentra presente en la región promotora de los genes codificantes para ciertos receptores de la membrana celular de los macrófagos, tales como MR, Dectina-1 y CD36; cuya expresión puede ser regulada por PPAR γ (Coste et al., 2003; Galès et al., 2010; Serghides et al., 2009). Por lo tanto, PPAR γ podría ser un buen blanco para la alteración de la expresión de los genes codificantes de los receptores mencionados, que finalmente conlleve a un efecto inmunomodulador contra parásitos que presenten los PAMPs adecuados asociados a dichos receptores.

2.2.4. Receptores en la membrana de los macrófagos activados por PPAR γ

Como se mencionó, entre los receptores presentes en la membrana de los macrófagos que pueden ser activados por PPAR γ se encuentran MR, Dectina-1 y CD36.

El MR permite el reconocimiento de determinados carbohidratos presentes en PAMPs glicoproteicos (McGreal, Miller, & Gordon, 2005), lo cual permite a su vez la fagocitosis de los patógenos. Se sabe también que dicho receptor está involucrado en la presentación de antígenos (Stahl & Ezekowitz, 1998).

En cuanto al receptor Dectina-1, se sabe que permite la fagocitosis de hongos por reconocimiento de β -1,3- y β -1,6-glucanos presentes en sus paredes celulares (McGreal et al., 2005). Además, promueve la producción de ROS por parte de los macrófagos y la inducción de citoquinas inflamatorias (Underhill, Rossnagle, Lowell, Simmons, & Dc, 2011).

Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de proteínas tipo lectina tipo-C (McGreal et al., 2005; Osorio & Reis e Sousa, 2011).

Otro receptor encontrado en la membrana de macrófagos es el CD36, una glicoproteína transmembrana, perteneciente y representante de la familia de receptores *scavenger* de clase B; este receptor permite la captación de LDL oxidado (Endemann et al., 1993), la fagocitosis de células apoptóticas (Greenberg et al., 2006) y de patógenos bacterianos (Baranova et al., 2008).

2.2.5. Ligandos activadores de PPAR γ

Los ligandos activadores de PPAR γ que se han encontrado pueden ser ligandos endógenos, sintéticos y compuestos aislados de productos naturales (por ej. plantas usadas en alimentos, plantas medicinales, etc.). Entre los ligandos endógenos se encuentran ácidos grasos y prostanoides (Dussault & Forman, 2000). Los ligandos sintéticos más conocidos son las tiazolidinedionas, estos ligandos de PPAR γ son los únicos aprobados como medicamentos y se usan en pacientes con diabetes tipo 2, para aliviar la resistencia a insulina (Yki-Järvinen, D., & C.P., 2016). La rosiglitazona es un ejemplo de estos ligandos sintéticos. Se sabe además que la activación de PPAR γ por sus ligandos endógenos es más débil que la que se observa con las tiazolidinedionas (Cho & Momose, 2008; Lehmann et al., 1995). Entre los activadores aislados de productos naturales se pueden encontrar ejemplos de diversos tipos de compuestos, como flavonoides (Mueller & Jungbauer, 2009), neolignanós (Atanasov et al., 2013), estilbenos (Calleri et al., 2014), amorfrutinas (Weidner et al., 2012), lactonas sesquiterpénicas (Zou et al., 2008), entre otros.

Se logró evidenciar por cristalografía de rayos X que los ligandos activadores de PPAR γ (en este caso ácidos grasos oxidados, ligandos endógenos) pueden unirse mediante enlace tanto covalente como no covalente (por interacciones intermoleculares como puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo, etc.) (Itoh et al., 2008). En cuanto a la unión covalente, Itoh y col. muestran que la cisteína 285 (Cys285) del LBD está involucrada y

puede unirse a un compuesto que presente un grupo aceptor de Michael (Figura 3).

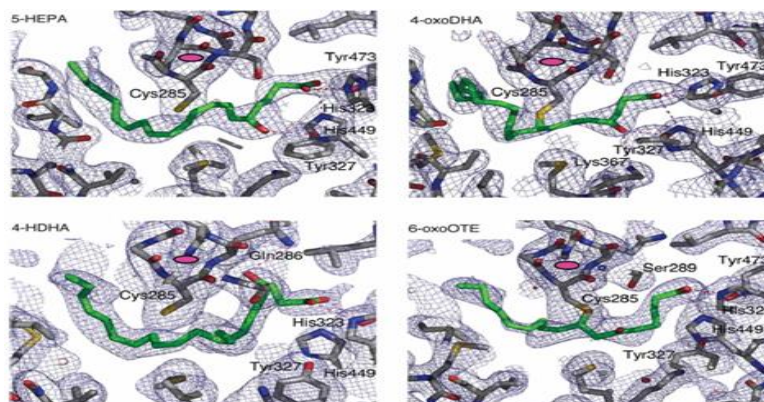


Figura 3. Parte del LBD del PPAR γ donde se muestran diferentes ligandos (en color verde) unidos tanto de forma no covalente (los dos de la izquierda, 5-HEPA y 4-HDHA) como covalente (los dos de la derecha, 4-oxoDHA y 6-oxoOTE). Se observa que la unión covalente se da con la Cys285 del PPAR γ (resaltada en amarillo) (Itoh et al., 2008).

2.2.6. Adición conjugada con aceptores de Michael en la unión del ligando a PPAR γ

La adición conjugada es una reacción de adición-1,4 de un nucleófilo a un alqueno conjugado con un grupo electroattractor. Un aceptor de Michael es un compuesto carbonílico α,β -insaturado, el cual es electrofílico y puede pasar por una adición conjugada. Un ejemplo de compuestos aceptores de Michael son las enonas (cetonas α,β -insaturadas) (Caprio & Williams, 2009). El mecanismo de esta reacción se muestra con un ejemplo en la Figura 4.

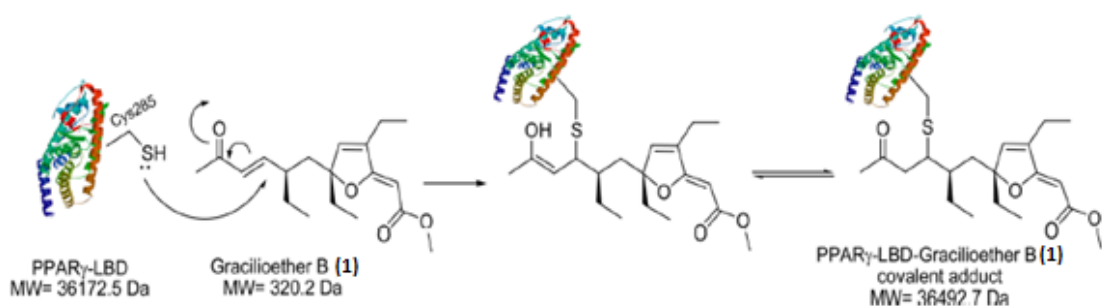


Figura 4. Mecanismo de la reacción de adición conjugada entre una cisteína (nucleófilo) y un compuesto con grupo aceptor de Michael (electrófilo), Gracilioether B (1) (Imagen tomada de Festa et al., 2012).

Se ha demostrado que PPAR γ puede ser activado por unión covalente de compuestos aceptores de Michael, que pueden actuar como electrófilos hacia las cisteínas presentes en el sitio de unión del ligando del PPAR γ (Festa et al., 2012; Itoh et al., 2008).

Así, utilizando compuestos con aceptores de Michael en su estructura se puede promover la activación de PPAR γ y de esta forma potenciar la expresión de los genes regulados por éste, y en particular de aquellos que corresponden a los receptores mencionados anteriormente.

2.2.7. Compuestos con aceptores de Michael aislados de plantas

Diversos grupos de investigación, entre ellos el de Cabanillas *et al.* (Cabanillas et al., 2014), observaron que entre los compuestos que aislaron de la planta *Renealmia thyrsoides*, hay dos que son capaces de promover la expresión de los genes que codifican los receptores MR, Dectina-1 y CD36 (Cabanillas et al., 2014). La estructura de dichos compuestos se puede observar en la Figura 5, en ella se aprecia el grupo aceptor de Michael en los compuestos 5 y 6, mientras que éste no está presente en los compuestos 2-4 con estructura similar. Dicho grupo indica que estos compuestos (5 y 6) estarían activando al PPAR γ por medio de una unión covalente a través de su grupo aceptor de Michael, y que dicha activación promueve la expresión de los tres genes mencionados, como se observa en la Figura 6. Se puede apreciar en dicha figura que los niveles de expresión relativa del ARNm de CD36 (blanco conocido de PPAR γ) aumentan al tratar a los macrófagos con rosiglitazona (ligando conocido de PPAR γ) y con los compuestos 5 y 6, pero no con los compuestos 2-4; lo cual es un indicio muy fuerte de la intervención del grupo aceptor de Michael en dicha activación.

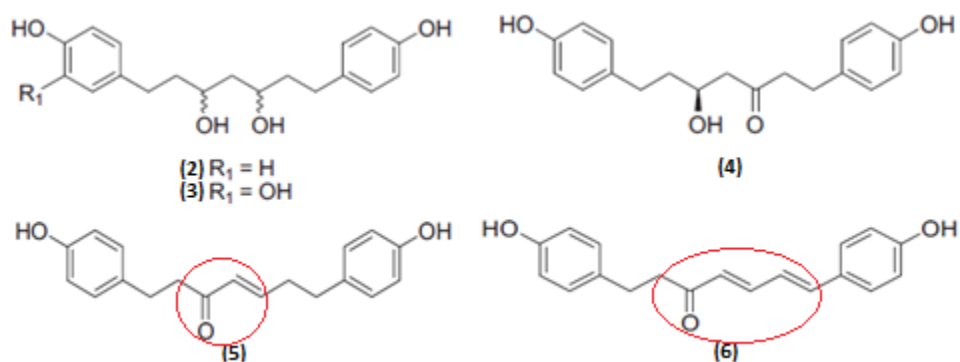


Figura 5. Algunos compuestos aislados de la planta *Renealmia thyrsoides*. Se puede observar que la principal diferencia entre los compuestos 5 y 6 con los compuestos 2-4 es la presencia o ausencia del grupo aceptor de Michael (señalado con un círculo rojo), respectivamente (Cabanillas et al., 2014).

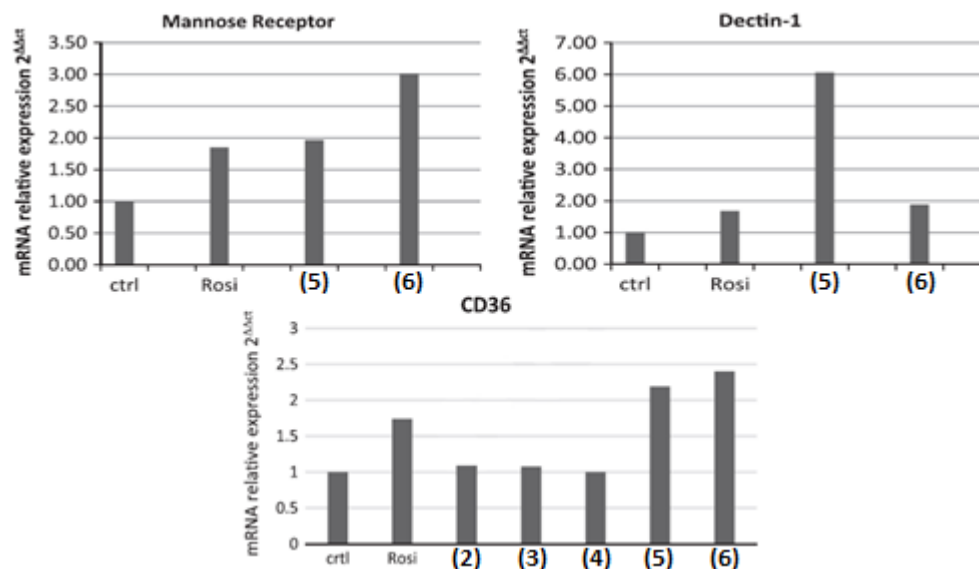


Figura 6. Expresión relativa del ARNm de los genes codificantes para MR, Dectina-1 y CD36. La expresión de dichos genes aumenta al tratar a los macrófagos con rosiglitazona y también al tratarlos con los compuestos

nombrados como 17 y 18 (que corresponden al 5 y 6 de la Figura 5, respectivamente), lo que da indicio de un efecto activador del PPAR γ por parte de éstos. Los compuestos nombrados como 14-16 son los compuestos 2-4 en el presente documento. (Gráficos tomados de Cabanillas et al., 2014).

2.2.8. *Schkuhria pinnata*

La planta *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze, popularmente conocida con el nombre de “canchalagua”, crece en el Perú a una altura comprendida entre 2000 y 3000 m.s.n.m. principalmente en Ayacucho, Ancash y Piura, y es usada como planta medicinal (Ramírez-Cruz, 2010). Entre las propiedades que se le atribuyen están las de diurética, antiinflamatoria, digestiva, antimicrobiana (Aguirre & Ugaz, 1990; Ramírez-Cruz, 2010), insecticida (Almela, 1961), antiacné (Bussmann, Sharon, P, & Barocio, 2008) y antimalárica (Muñoz et al., 2004; Muthaura et al., 2007).

Se han podido aislar los compuestos aceptores de Michael schkuhrin I y schkuhrin II de la planta *Schkuhria pinnata* (Figura 7) (Mokoka et al., 2013). También de esta planta se han podido aislar compuestos como heliangolidos (Bohlmann & Zdero, 1981), diversas lactonas sesquiterpénicas (Ganzer & Jakupovic, 1990; Pacciaroni, Sosa, Espinar, & Oberti, 1995), entre otros (León, Reyes, Chávez, Toscano, & Delgado, 2009), en cuya estructura está presente un grupo aceptor de Michael, los cuales podrían ser utilizados como activadores de PPAR γ . En el mismo

estudio realizado por Mokoka *et al.*, el extracto de DCM/MeOH de *Schkuhria pinnata* tuvo valores bajos de IC₅₀ (indicativos de compuestos con buena actividad biológica) contra *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *T. cruzi* y *Plasmodium falciparum* en comparación con los extractos de otras plantas analizados por ellos; también indican que los compuestos schkuhrin I y schkuhrin II aislados fueron identificados como buenos agentes antiprotozoarios (Mokoka et al., 2013). Por tanto, un estudio de ambos compuestos en cuanto a su capacidad de mejorar la acción inmunológica de los macrófagos frente a *Leishmania* resulta interesante.

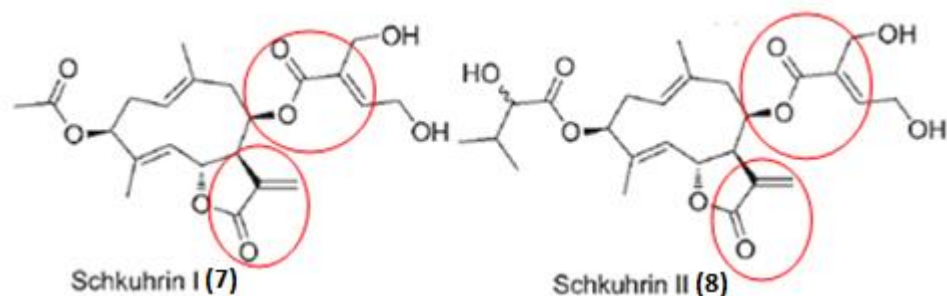


Figura 7. Compuestos aislados de *Schkuhria pinnata* (Schkuhrin I y Schkuhrin II). Se resalta los grupos aceptores de Michael de estos compuestos con círculos rojos.

2.2.9. *Leishmania*, un parásito en relación estrecha con los macrófagos

Los protozoarios tripanosomátidos del género *Leishmania* son parásitos que causan la enfermedad conocida como Leishmaniasis, la cual se presenta en diferentes cuadros clínicos dependiendo de la especie infectante de parásito (Chappuis et al., 2007).

La infección en los humanos y otros mamíferos por estos parásitos cumple un ciclo que inicia con la picadura de insectos vectores flebótomos del género *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) o *Lutzomyia* (en el Nuevo Mundo), que alojan a los parásitos en su intestino y glándulas salivales. Tras la picadura, los parásitos son transmitidos en un estadio flagelado de promastigote. La saliva de los dípteros ayuda a establecer la infección causando vasodilatación y eritema (Sacks & Kamhawi, 2001). El promastigote en el hospedero es fagocitado por los macrófagos dentro de los cuales pasa a un estadio no flagelado de amastigote. Cuando un hospedero infectado es picado por un flebótomo no infectado, los parásitos pueden ser ingeridos por el insecto, transformándose éste en un nuevo vector de la enfermedad. El amastigote proveniente del hospedero infectado, nuevamente adopta la forma de promastigote en el flebótomo, cerrando de esta manera el ciclo (Boelaert & Sundar, 2014).

Frente a dicho escenario un patógeno sería eliminado una vez dentro del fagolisosoma de los macrófagos, sin embargo, la particularidad de estos parásitos es que son capaces de sobrevivir luego de pasar al estadio de amastigote. Este hecho convierte a la leishmaniasis en una enfermedad

oportunista, que se desarrolla fácilmente en un individuo con el sistema inmunitario debilitado (Russo et al., 2003). Por otro lado, incluso los individuos con sistema inmunitario más fuerte, son capaces de curarse de la enfermedad sin intervención (Rocha et al., 1995). En el caso de la leishmaniasis visceral (kala-azar), la cual es más difícil de diagnosticar tempranamente, el tratamiento tardío o el no tratamiento del paciente puede llevar a la muerte (Chappuis et al., 2007), mientras que en algunos casos de leishmaniasis visceral curada exitosamente puede presentarse como secuela la leishmaniasis cutánea post-kala-azar (Zijlstra, Musa, Khalil, El Hassan, & El-Hassan, 2003).

2.2.10. Interacción macrófago-*Leishmania*

Los parásitos del género *Leishmania* poseen en su membrana ciertos componentes como lipofosfoglicanos y glicoproteína 63 (gp63) que les permite escapar de una lisis por activación del sistema del complemento (Boelaert & Sundar, 2014). Sin embargo, estos son reconocidos y fagocitados por los macrófagos del hospedero (Silvestre, Santarem, Tavares, Silva, & Cordeiro-da-Silva, 2009). Dicho reconocimiento e internalización de los parásitos se da a través de diversos receptores. La posterior señalización para la activación de mecanismos de eliminación del parásito se da a través de los receptores MR, Dectina-1 y TLR-2 (Toll-like receptor 2) (Lefèvre et al., 2013). Se ha propuesto también que los parásitos estarían usando a los neutrófilos como “caballos de Troya”, pues

estarían siendo fagocitados por éstos como primera línea de defensa, luego de lo cual dichas células pasan a un estado de apoptosis ralentizado por los parásitos, y son finalmente fagocitados por los macrófagos (Peters et al., 2008; van Zandbergen et al., 2004; van Zandbergen, Solbach, & Laskay, 2007). Un análisis detallado de las poblaciones de células mieloides infectadas por *L. major* en la dermis de oreja de ratones C57BL/6 confirmó que los neutrófilos son las primeras células reclutadas e infectadas en el sitio de la infección, luego de lo cual el parásito explota el efecto anti-inflamatorio asociado con la remoción de neutrófilos apoptóticos (por las células dendríticas) para promover el proceso infeccioso en etapa temprana (Ribeiro-Gomes, Peters, Debrabant, & Sacks, 2012).

Una vez dentro del fagolisosoma de los macrófagos, los parásitos cambian a un estadio redondeado no flagelado denominado amastigote, frente a las nuevas condiciones de pH y temperatura a las que son sometidos. Al encontrarse en este estadio los parásitos son capaces de multiplicarse dentro del fagolisosoma, por lo tanto el incremento del número de parásitos por célula provoca la lisis del macrófago permitiendo la liberación de los mismos y favoreciendo la continuidad de la infección (Boelaert & Sundar, 2014).

En el trabajo realizado por Lefèvre *et al.* (Lefèvre et al., 2013) se demuestra que la carencia de cualquiera de los receptores Dectina-1 y MR afecta negativamente la acción antiparasitaria de los macrófagos frente a *Leishmania infantum* (y *L. donovani*), causantes de leishmaniasis visceral,

en cuanto a que disminuye su capacidad de interacción (unión), fagocitosis y producción de ROS. Es más, el número de parásitos luego de dos semanas de la infección fue mayor en los ratones con macrófagos carentes de cualquiera de estos dos receptores. Lo cual indica que ambos (Dectina-1 y MR) son importantes para la respuesta inmunitaria frente a estos parásitos. También en el trabajo de Lefèvre *et al* se muestra que ambos receptores son esenciales para la producción de ROS en respuesta a *L. infantum*, a través de las rutas de señalización de fosforilación Dectina-1-Syk-p47phox y oxidación MR-AA-NADPH.

Por lo tanto, provocando un incremento en la expresión de los PRRs en los macrófagos, en particular MR y Dectina-1, podría ayudar al sistema inmunitario innato del paciente a luchar contra la leishmaniasis. Dicha mejora podría darse activando al PPAR γ .

2.3. JUSTIFICACIÓN

Analizando todo lo anterior es factible pensar que la planta *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze posiblemente deba alguna de sus actividades medicinales, como por ejemplo las antimicrobianas y antimaláricas, al hecho de presentar compuestos aceptores de Michael que podrían estar activando al PPAR γ , lo que ocasionaría un aumento en la expresión de los receptores PRRs como MR, Dectina-1 y CD36, en la membrana de los macrófagos. Es decir, dichos compuestos estarían ejerciendo una inmunomodulación.

Al estar los macrófagos tan íntimamente relacionados con los parásitos causantes de la leishmaniasis, y al ser los receptores MR y Dectina-1 los responsables de su fagocitosis y en cierta medida también de su eliminación, se propuso, en el presente estudio, que un incremento en la expresión de dichos receptores, por parte de los compuestos con aceptores de Michael SKI y SKII, podría modular positivamente la inmunidad innata mediada por macrófagos para hacer frente a los parásitos *Leishmania*, y en particular a *Leishmania infantum*, una de las especies cuyo cuadro clínico puede llegar a ser mortal.

2.4. OBJETIVOS

2.4.1. Objetivo general

Explorar la actividad inmunomoduladora de los compuestos schkuhrin I y schkuhrin II en la respuesta inmunitaria de macrófagos peritoneales de ratón, sobre *Leishmania infantum*.

2.4.2. Objetivos específicos

- Aislar e identificar los compuestos con aceptores de Michael, schkuhrin I y schkuhrin II, de la planta *Schkuhria pinnata*.
- Evaluar si los compuestos aislados provocan un aumento de la expresión de los genes que codifican a los receptores MR, Dectina-1 y CD36.
- Evaluar la capacidad de dichos compuestos para mejorar la fagocitosis y producción de ROS por parte de macrófagos peritoneales de ratón frente a *Leishmania infantum*.

III. METODOLOGÍA

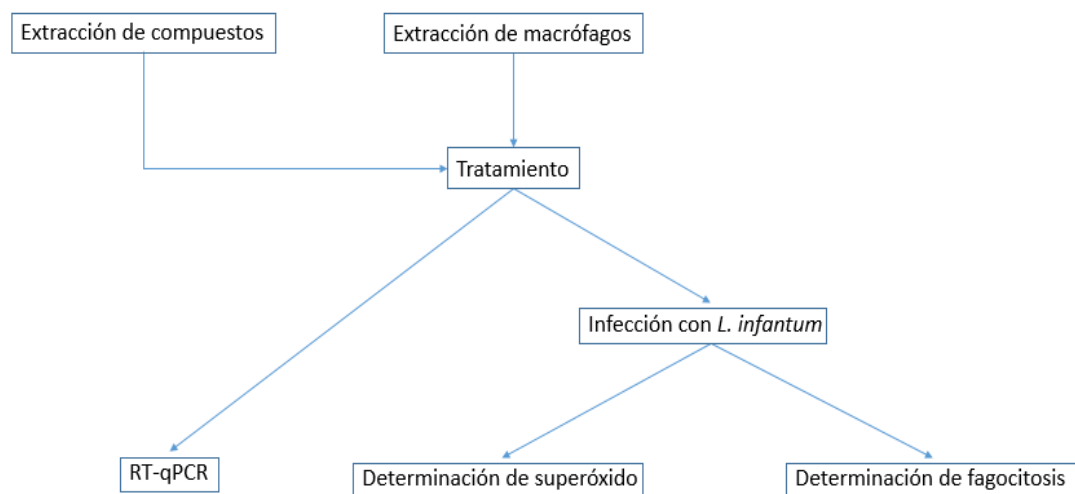
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio experimental comparando tres niveles de medición de la inmunomodulación de macrófagos: producción de superóxido, fagocitosis de *L. infantum* y expresión génica de receptores (MR, Dectina-1 y CD36). La comparación se realizó entre 3 grupos de macrófagos: control sin tratamiento, control positivo tratado con rosiglitazona 5 μ M, y macrófagos tratados con los compuestos de interés (schkuhrin I y schkuhrin II). Los controles sin tratamiento estuvieron en contacto con el vehículo de administración de los compuestos (DMSO) a la misma concentración (máximo 0.1%), durante el mismo tiempo de tratamiento. El tratamiento se realizó durante 24 horas para la medición de superóxido y fagocitosis, y durante 18 horas para la medición de la expresión génica.

3.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Unidad de medida	Escala
Tipo de compuesto	Compuesto utilizado para tratar a los macrófagos	Compuestos schkuhrin I, schkuhrin II y Rosiglitazona	-	Compuesto utilizado	Nombre y concentración de los compuestos	Nominal
Inmunomodulación	Alteración positiva o negativa del sistema inmunitario provocada por alguna sustancia	Grado de modificación en la capacidad efectora o en la respuesta inmunitaria de los macrófagos	Producción de superóxido	Absorbancia a 595 nm	Unidades de absorbancia	Intervalos
			Fagocitosis	Índice de fagocitosis	Índice de fagocitosis	Intervalos
			Expresión génica	Nivel de expresión relativa normalizada	<i>Fold change</i> respecto al control sin tratamiento	Intervalos

3.3. FLUJOGRAMA DE TRABAJO



3.4. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

3.4.1. Aislamiento, identificación y purificación de schkuhrin I y schkuhrin

II

3.4.1.1. Material vegetal: La planta *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze fue comprada el Mercado Modelo de Chiclayo, y depositada en el herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (constancia No. 033-2017-USM-MHN).

3.4.1.2. Aislamiento: Se realizó una extracción a partir de 192 g de las partes aéreas de la planta *Schkuhria pinnata* secas y molidas, las cuales fueron maceradas con 1 L de DCM durante 48 horas en oscuridad. Pasado este tiempo, se filtró por gravedad el macerado utilizando papel de filtro comercial. El material vegetal aún húmedo luego de filtrado fue esparcido sobre una bandeja de vidrio y se dejó secando por 48 horas. Por otro lado, el filtrado fue evaporado y secado en una estufa a 37°C, hasta la eliminación completa del solvente.

Una vez seco el material vegetal, fue extraído nuevamente con 1 L de una mezcla de DCM/MeOH (1:1). Luego de 48 horas de maceración se filtró y se repitió el procedimiento usando 1 L adicional de una mezcla de DCM/MeOH (1:1).

Luego de extraído una vez con DCM y dos veces con DCM/MeOH (1:1), el material vegetal (seco) pasó por una última extracción con 1 L de MeOH.

Luego de obtenidos los extractos, se realizó una cromatografía líquida a mediana presión (MPLC) para 2.0059 g del extracto DCM y otra para 1.9923 g del extracto DCM/MeOH. La columna de MPLC (230 x 37 mm) fue empacada con sílica gel 60 (15-40 µm), hasta aproximadamente 190 mm de altura, usando 500 mL de una mezcla de éter de petróleo (EP)/acetato de etilo (EtOAc) (1:1). Para colocar el extracto en la columna, se disolvió en aproximadamente 10 mL de DCM, se transfirió a un balón de vidrio de 50 mL y se le agregó sílica gel 60 (15-40 µm); se

mezcló bien y se puso a evaporar todo el solvente, para que quede impregnado en la sílica. Finalmente, la sílica impregnada fue depositada encima de la sílica en la columna de MPLC.

La corrida de MPLC se realizó empleando 500 mL de cada uno de los siguientes solventes:

1° EP/EtOAc (1:1)

2° EtOAc

3° EtOAc/MeOH (9.8:0.2)

4° EtOAc/MeOH (9.5:0.5)

5° EtOAc/MeOH (9:1)

Durante la corrida de MPLC se fueron colectando fracciones de 20 mL cada una en tubos de vidrio. Una vez colectadas, se analizó una alícuota de cada fracción por cromatografía de capa fina (TLC) usando una mezcla de DCM/MeOH (9.5:0.5) como fase móvil. Finalmente, se juntaron las fracciones que, de acuerdo a su perfil de TLC, resultaron similares. Se nombraron las fracciones según el extracto de procedencia como: DCM-x y DCM/MeOH-x (donde, x = 1; 2; 3, etc.).

3.4.1.3. Identificación: Se analizaron las fracciones obtenidas del aislamiento por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), tomando como referencia las condiciones de corrida usadas por Mokoka et al. (Mokoka et al., 2013), esto para tener un primer indicio de cuáles podrían contener a los compuestos buscados por comparación de los cromatogramas. Se

utilizaron las siguientes condiciones: gradiente de elución de agua/acetonitrilo (ACN) (90:10) a (0:100) por 30 min a un flujo de 1 mL/min, luego un lavado con ACN por 10 min, regreso a las condiciones iniciales a un flujo de 1 mL/min por 5 min y finalmente agua/ACN (90:10) por 5 min. Se utilizó una columna Purospher® STAR RP-18 endcapped (5 µm) LiChroCART®250-4.6 y un detector DAD a una longitud de onda de detección de 254 nm.

Finalmente se analizó una alícuota de cada una de las fracciones elegidas por RMN y MS para determinar la identidad de los compuestos. Para el análisis de RMN se utilizó un espectrómetro Bruker Avance 300 con cloroformo deuterado como solvente. En cuanto al análisis de MS se utilizó un espectrómetro de masas Thermo-Fisher Finnigan LCQ DECA XP MAX (San Jose, CA, USA), con analizador de masas de trampa de iones, y con fuente de ionización ESI en modo positivo.

3.4.1.4. Purificación de las fracciones DCM-4 y DCM-6: Se probaron por TLC diferentes mezclas de solventes para encontrar una que separe mejor los compuestos, escogiendo finalmente una mezcla de éter de petróleo (EP)/Acetato de etilo (EtOAc) (1.5:8.5).

La purificación se realizó pasando por una columna de extracción en fase sólida (SPE), 40 mg de las fracciones DCM-4 y DCM-6, impregnándola previamente en sílica gel (como se hizo para la separación con MPLC).

3.4.2. Extracción y tratamiento de macrófagos peritoneales de ratón

Los macrófagos para todos los experimentos biológicos fueron extraídos a partir de ratones BALB/c machos entre 6-10 semanas de edad, utilizando medio de cultivo M199c que consiste de medio M199 (Sigma, código M0393) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, penicilina 50 U/mL y estreptomycinina 50 µg/mL.

Una vez eutanizados los ratones, según los procedimientos aprobados por el Comité institucional de Ética para el uso de Animales (UPCH), éstos fueron desinfectados con alcohol al 70%. Luego, bajo condiciones estériles, se procedió a separar la piel del vientre e inyectar medio M199c frío (4° C) en el peritoneo, siguiendo el procedimiento descrito por Sauvain *et al.* (Sauvain et al., 1993). Después de dar unos ligeros masajes al peritoneo, se extrajo el medio de cultivo y se contó los macrófagos con el colorante rojo neutro (*neutral red*). Las células así extraídas se colocaron en placas de 96 pozos (o frasco de cultivo en el experimento de expresión génica) a concentraciones de macrófagos requeridas de acuerdo al experimento a realizar. Las placas se incubaron por 1 hora a 37 °C y 5% CO₂ para dejar que los macrófagos se adhieran a ella y luego se lavaron con medio M199 tibio (37 °C). Finalmente se colocó en los pozos con macrófagos medio M199c con compuesto (rosiglitazona, schkuhrin I o schkuhrin II) o sin compuesto (DMSO solo) y se dejó incubar a 37 °C y 5% CO₂ por el tiempo requerido de acuerdo al experimento. Las condiciones empleadas (concentraciones de compuestos, tiempo de

incubación, etc.) están detalladas en el apartado correspondiente a cada experimento.

3.4.3. Mantenimiento de parásitos

Los parásitos *Leishmania infantum* cepa clonal MHOM/MA/67/ITMAP-263 modificada genéticamente para expresar el gen codificante de luciferasa y proporcionados por el Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD) – Francia, fueron mantenidos en estadio de promastigote en medio M199c, mediante repiques continuos cada 3 días. Para todas las infecciones realizadas se utilizaron promastigotes en fase estacionaria tardía de crecimiento (séptimo día de repique, determinado por curva de crecimiento), por resultar ser más infecciosos (datos no mostrados).

3.4.4. Viabilidad de macrófagos

La viabilidad celular se evaluó mediante dos métodos; un método colorimétrico utilizando MTT, y un método de conteo utilizando Azul de tripano (ácido (3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4'-diil)di(1Z)hidracin-2-il-1-ilideno]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihidronaftaleno-2,7-disulfónico).

Ambos métodos se llevaron a cabo en placas de 96 pozos, colocando 7×10^4 macrófagos/pozo. Luego de extraídos los MPR y de incubarlos por 24 horas, se les cambió el medio de cultivo por uno fresco previamente atemperado, y se les adicionó los compuestos a las siguientes concentraciones:

- Schkuhrin I: 20, 10, 5 y 2.5 μM
- Schkuhrin II: 18, 9, 4.5 y 2.25 μM
- Anfotericina B: 10, 5, 2.5 y 1.25 μM (como compuesto de referencia por su demostrada actividad antileishmanial (Delmas et al., 2004))

Los macrófagos fueron incubados con las drogas durante 48 horas a 37 °C y 5% CO₂. Luego de este tiempo se realizó el siguiente procedimiento para cada método:

3.4.4.1. MTT: Se adicionó 20 μL de MTT a 5 mg/mL a los pozos a evaluar, luego se cubrió la placa con papel aluminio y se incubó nuevamente por 4 horas. Finalmente, se les adicionó 100 μL de una mezcla acuosa con 10% SDS y 50% isopropanol a pH 5.4 (solución stop), y se realizó la lectura de absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas.

3.4.4.2. Azul de tripán: Se eliminó el medio de cultivo de cada pozo y se agregó inmediatamente 10 μL del colorante azul de tripán (*trypan blue*) esterilizado por filtración. Luego se contó rápidamente las células no coloreadas, en una cuarta parte del campo de visión observado en un microscopio invertido a un aumento de 400X, cuyo lente ocular se había dividido previamente en 4 partes iguales usando un marcador indeleble.

3.4.5. Expresión génica

Se evaluó la expresión génica mediante un experimento de transcripción reversa seguido de PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR), para los siguientes genes murinos: *Pparg* (PPAR γ), *Clec7a* (dectina-1), *Mrc1* (receptor de manosa) y *Cd36* (CD36). Además, se amplificaron en paralelo los genes *Actb* (β -actina) y *Hprt* (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa), los que fueron evaluados como genes de referencia (*housekeeping*) candidatos. Dicha evaluación se realizó en macrófagos peritoneales de ratón sin tratamiento, tratados con rosiglitazona a 5 μ M (control positivo), schkuhrin I y schkuhrin II, a 1 y 0.1 μ M.

La extracción de ARN se realizó utilizando el kit comercial GeneJET RNA Purification (Thermo Scientific), siguiendo el protocolo del inserto. El ARN obtenido fue tratado con DNAsa I (Thermo Scientific) y cuantificado mediante el fluorómetro Qubit (Invitrogen) con el kit Quant-iTTM RNA Assay (Invitrogen). La síntesis de cDNA se realizó a partir de 600 - 900 ng de ARN utilizando el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche), utilizando a la vez cebadores oligodT y hexámeros aleatorios. Finalmente, el ensayo de qPCR se realizó en un equipo Lightcycler® 480 (Roche), en un volumen final de reacción de 20 μ L, que contenía iQTM SYBR® Green Supermix (BioRad), el par de cebadores correspondientes al respectivo gen y 2 μ L de cDNA (diluido 1/10). Las amplificaciones para todos los genes en estudio fueron realizadas siguiendo el programa mostrado en la Tabla 1 (el cuál fue validado por la verificación de las

eficiencias), obteniendo finalmente el ciclo de cuantificación (C_q , ciclo en el que la señal de fluorescencia es diferenciada cuantitativamente de la fluorescencia basal), mostrado por el equipo. Las secuencias de los cebadores utilizados fueron, para el gen *Hprt* las usadas por Oswald et al. (Oswald, Wynn, Sher, & James, 1992), y para los demás genes aquellas reportadas por Lefèvre et al. (Lefèvre et al., 2010) (Tabla 2).

Tabla 1. Programa de ciclamiento para el ensayo de qPCR utilizado para todos los genes.

Fase	Número de ciclos	Temp. (°C)	Tiempo	Tasa de rampa (°C/s)
Pre-incubación	1	95	5 min	4.4
Amplificación	60	95	10 seg	4.4
		60	10 seg	2.2
		72	10 seg	4.4
Curva de Melting	1	95	5 seg	4.4
		65	1 min	2.2
		95	-	0.03 (20 adquisiciones por °C)
Enfriamiento	1	40	1 min	2.2

Tabla 2. Secuencias de cebadores usados para la amplificación de los genes durante el ensayo de qPCR.

Gen	Proteína	Secuencia de cebadores
<i>Mrc1</i>	MR	Sentido 5' ATG CCA AGT GGG AAA ATC TG 3' Antisentido 5' TGT AGC AGT GGC CTG CAT AG 3'
<i>Clec7a</i>	Dectina-1	Sentido 5' CAT CGT CTC ACC GTA TTA ATG CAT 3' Antisentido 5' CCC AGA ACC ATG GCC CTT 3'
<i>Cd36</i>	CD36	Sentido 5' GCA GAA TCA AGG GAG AGC AC 3' Antisentido 5' GAG CAA CTG GTG GAT GGT TT 3'
<i>Pparg</i>	PPARγ	Sentido 5' AAT CCT TGG CCC TCT GAG AT 3' Antisentido 5' TTT TCA AGG GTG CCA GTT TC 3'
<i>Actb</i>	B-actina	Sentido 5' AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC 3' Antisentido 5' CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA 3'
<i>Hprt</i>	HPRT	Sentido 5' GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG 3' Antisentido 5' GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC 3'

Todos los cálculos se realizaron utilizando el software qBase+ (Biogazelle), el cual incorpora algoritmos para el cálculo de expresión génica relativa normalizada empleando múltiples genes de referencia, basado en el método de Hellemans y Vandesompele (Hellemans, Mortier, Paepe, Speleman, & Vandesompele, 2007; Vandesompele, Preter, Poppe, Roy, & Paepe, 2002). Al utilizar dicho método, se tomó en consideración tanto la posible variación que podría darse en los genes de referencia, así como la eficiencia del PCR para cada gen.

3.4.5.1. Determinación de la eficiencia del PCR

Durante la estandarización del ensayo de qPCR, se determinó la eficiencia de amplificación de la reacción de PCR para cada gen con el par de cebadores específicos, a partir de una curva estándar generada por diluciones seriadas 1/2 de una muestra de cDNA de macrófagos sin tratamiento. Se consideró como eficiencia de amplificación óptima a valores entre 90% y 110% (Taylor, Wakem, Dijkman, Alsarraj, & Nguyen, 2010).

Para el cálculo de eficiencia para cada gen, primero se determinó la pendiente de la recta de regresión generada en un gráfico de curva estándar (C_q vs $\log[\text{cDNA}]$; donde, [cDNA] fue asumida para fines prácticos como 1, 2, 4, 8, 16). Luego de obtenido el valor de dicha pendiente, la eficiencia (E) fue calculada de la siguiente manera:

$$E = 10^{-\left(\frac{1}{\text{pendiente}}\right)}$$

3.4.5.2. Cálculo del *Fold change* (FC)

La tasa de variación de las cantidades relativas normalizadas (CRN) respecto a los macrófagos control sin tratamiento, o *fold change* (FC), fue calculada siguiendo los siguientes pasos (Hellemans et al., 2007):

1. Conversión del C_q en cantidades relativas (CR), para cada gen:

$$\overline{C}_{q_{gen}} = \frac{\sum_{i=1}^n C_{q_{gen_i}}}{n}$$

n: Total de réplicas técnicas

i: Replica técnica número i

$$\overline{C}_{q_{Intertratamiento}} = \frac{\sum_{j=1}^s \overline{C}_{q_{gen_j}}}{s}$$

s: Total de tratamientos (ST, con Rosi, con SKI y con SKII)

j: tratamiento número j

$$\Delta C_{q_{gen}} = \overline{C}_{q_{Intertratamiento}} - \overline{C}_{q_{gen}}$$

$$CR_{gen} = E_{gen}^{\Delta C_{q_{gen}}}$$

2. Cálculo del factor de normalización (FN), basado en la media geométrica de las CR de los genes de referencia:

$$FN = \sqrt[N]{\prod_{r=1}^N CR_{Ref_r}}$$

N: Número de genes de referencia

r: Gen de referencia número r

3. Determinación de la cantidad relativa normalizada (CRN) para un gen bajo un determinado tratamiento:

$$CRN_{gen_{tratamiento}} = \frac{CR_{gen_{tratamiento}}}{FN}$$

4. Cálculo del *Fold change* (FC) respecto al control sin tratamiento (ST)*:

$$FC_{gen_{tratamiento}} = \frac{CRN_{gen_{tratamiento}}}{CRN_{gen_{ST}}}$$

*Para los valores de $FC < 1$, se tomó el recíproco negativo del FC.

3.4.6. Medición de superóxido

La medición de liberación de superóxido se realizó teniendo como referencia el procedimiento colorimétrico descrito por Choi y col. (Choi, 2016), en el que utilizan nitroazul de tetrazolio (NBT).

Los macrófagos fueron tratados con rosiglitazona 5 μM , schkuhrin I 0.1 μM o schkuhrin II 0.1 μM , durante 24 horas. Pasado este tiempo se cambió el medio con compuestos por un nuevo medio sin compuestos y se estimularon las células para la producción de superóxido, incubándolos con PMA (forbol miristato acetato) 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o *L. infantum* a una proporción de 1:20 (macrófago:parásitos), y NBT 0.5 mg/mL , durante 15, 30, 60, 90 o 120 minutos a 37 °C y 5% CO_2 . Luego del tiempo de estímulo las células fueron fijadas a los pozos con 100 μL de MeOH, para después lisarlas con 120 μL de una solución 2M de KOH. El formazán liberado fue disuelto agregando 140 μL de DMSO y dejando la placa por 10 minutos en agitación lenta. Finalmente se realizó la lectura de absorbancia a 650 nm en un lector de microplacas.

3.4.7. Evaluación de la fagocitosis

Para este experimento, se colocaron láminas de vidrio en los pozos de las placas de 96 pozos antes de agregar las células. Luego del tratamiento de los macrófagos por 24 horas con los compuestos rosiglitazona a 5 μM , schkuhrin I a 1 y 0.1 μM o schkuhrin II a 1 y 0.1 μM , se reemplazó el medio de cultivo con uno nuevo sin compuestos. Luego, se realizó una

infección con *L. infantum* a una proporción de 1:10 (macrófago:parásitos). Los macrófagos estuvieron en contacto con los parásitos durante 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 minutos. Transcurrido el tiempo de infección, se removió el medio con parásitos y posteriormente las láminas, las cuales fueron sumergidas en MeOH durante 5 min para fijar las células. Finalmente, las láminas fueron teñidas con colorante Giemsa y observadas al microscopio. El índice de fagocitosis fue determinado como el porcentaje de macrófagos que fagocitaron al menos un parásito, multiplicado por el promedio de parásitos en 100 macrófagos (Palatnik, 1989).

3.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El protocolo del presente estudio fue presentado y aprobado por el Comité de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la UPCH, bajo la constancia 001-05-16 (anexo 1). También se obtuvo la autorización del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) para investigar sobre flora silvestre bajo la resolución No. 167-2016-SERFOR/DGGSPFFS.

3.6. PLAN DE ANÁLISIS

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Al ser todas las variables dependientes cuantitativas, la medida de tendencia central utilizada fue la media y la medida de dispersión la desviación estándar, incluyendo además en los gráficos el intervalo de confianza (I.C.) al 95%. Se evaluó la normalidad de los resultados por medio de una prueba de Shapiro-Wilk. Para los datos que cumplieron con dicha distribución se determinó la significación estadística por una prueba t-Student bilateral, caso contrario se usó una prueba no paramétrica: prueba de Mann-Whitney. Se consideró un nivel de significación de 0.05.

IV. RESULTADOS

4.1. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN

Luego de la maceración de *Schkuhria pinnata* con los 3 solventes (DCM, DCM/MeOH y MeOH) se registró para cada uno de los extractos las siguientes masas:

- Extracto DCM: 4.23 g
- Extracto DCM/MeOH: 9.09 g
- Extracto MeOH: 4.31 g

A partir de la MPLC se colectaron un total de 96 fracciones para el extracto DCM y 95 fracciones para el extracto DCM/MeOH, de aproximadamente 20 mL cada una. Luego de observar sus perfiles de TLC, las fracciones fueron juntadas según lo mostrado en las tablas 3 y 4, respectivamente. En la figura 8 se muestra las TLC de las 7 fracciones resultantes para cada extracto.

Tabla 3. Rangos del número de tubos que se colocaron en cada fracción para el extracto DCM. Se muestra también la cantidad relativa de las fracciones obtenidas por MPLC, en porcentajes (%).

Fracción	Rango de tubos Extracto DCM	Extracto DCM (% recuperado)
DCM-1	1-10	34.4
DCM-2	11-29	8.7
DCM-3	30-35	11.6
DCM-4	36-43	15.0
DCM-5	44-48	2.9
DCM-6	49-57	3.7
DCM-7	58-96	0.2
	Total	76.5

Tabla 4. Rangos del número de tubos que se colocaron en cada fracción para el extracto DCM/MeOH. Se muestra también la cantidad relativa de las fracciones obtenidas por MPLC, en porcentajes (%).

N° de fracción	Rango de tubos Extracto DCM/MeOH	Extracto DCM/MeOH (% recuperado)
DCM/MeOH-1	1-8	4.4
DCM/MeOH-2	9-29	2.6
DCM/MeOH-3	30-33	0.9
DCM/MeOH-4	34-36	1.0
DCM/MeOH-5	37-41	1.7
DCM/MeOH-6	42-55	0.2
DCM/MeOH-7	56-95	4.9
	Total	15.7

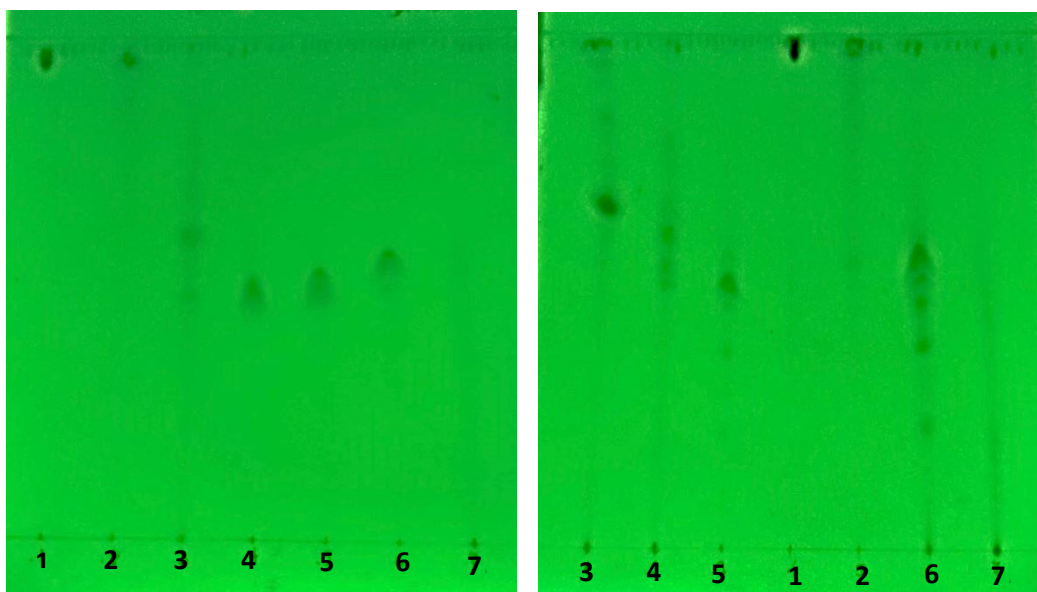


Figura 8. Placa de cromatografía de placa delgada (TLC) de las 7 fracciones obtenidas luego de la MPLC del extracto DCM (izquierda) y DCM/MeOH (derecha). El sistema de solventes utilizado fue una mezcla de DCM/MeOH (9.5 : 0.5) Los números indican el orden de elución mostrado en las tablas 3 y 4, de las fracciones por la MPLC.

Basándose en el perfil de TLC de las fracciones se decidió analizar por HPLC las fracciones DCM-4 y DCM-6 y las fracciones DCM/MeOH-3, DCM/MeOH-4, DCM/MeOH-5 y DCM/MeOH-6; siguiendo las condiciones de corrida usadas por Mokoka *et al.* (Mokoka et al., 2013), para saber cuáles de estas fracciones podrían contener a los compuestos buscados por comparación de los cromatogramas. De estos se vio que ambas fracciones del extracto DCM y las fracciones DCM/MeOH-3 y DCM/MeOH-6 del extracto tenían picos a tiempos de retención (15 y 16.5 minutos) similares a los que corresponden a los compuestos buscados que

aparecen en el cromatograma mostrado por Mokoka (14 y 15.5). Por este motivo, se analizó una muestra de estas cuatro fracciones por RMN y MS. Se puede observar que los espectros RMN obtenidos (anexo 2) muestran señales que se corresponden con las reportadas por Pettei *et al.* (Pettei, Miura, Kubo, & Nakanichi, 1978) para los compuestos schkuhrin I y schkuhrin II; indicando que las fracciones DCM-4 y DCM/MeOH-5 contenían mayoritariamente al compuesto schkuhrin II (con purezas determinadas por HPLC de 74% y 38%, respectivamente), la fracción DCM-6 contenía mayoritariamente al compuesto schkuhrin I (a una pureza determinada por HPLC de 60%), y la fracción DCM/MeOH-6 contenía mayoritariamente una mezcla de ambos compuestos. Adicionalmente, se puede apreciar en los espectros de masa de los compuestos (anexo 2) que se obtienen picos con masas de 443 $[M+Na]^+$ para schkuhrin I y de 501 $[M+Na]^+$ para schkuhrin II. Además se observa que el pico a 501 también aparece en el espectro de schkuhrin I, sugiriendo la presencia de schkuhrin II, el cuál fue posteriormente purificado.

Tomando en cuenta las cantidades de las fracciones y las purezas obtenidas por HPLC, se decidió purificar sólo las fracciones DCM-4 y DCM-6, que contienen a schkuhrin II y schkuhrin I como compuestos mayoritarios, respectivamente. Luego de la purificación por SPE de los compuestos se los logró obtener en una pureza de 81% para schkuhrin I y 91% para schkuhrin II, ambas determinadas por HPLC.

4.2. VIABILIDAD DE MACRÓFAGOS

En la tabla 5 se muestran las concentraciones de los compuestos schkuhrin I, schkuhrin II y el compuesto de referencia anfotericina B; a las cuales no son viables el 10, 50 y 90 % de macrófagos, determinadas por ambos métodos (reducción de MTT y permeabilidad de membrana con azul de tripán). Las concentraciones CC₁₀ sirvieron como referencia para escoger las posteriores concentraciones para los tratamientos de los macrófagos, por ser las menos tóxicas determinadas. Así, se eligió trabajar a las concentraciones de 5, 1 y 0.1 μM , para asegurar una baja toxicidad de los compuestos.

Tabla 5. Concentración citotóxica al 10 %, 50 % y 90 % para macrófagos peritoneales de ratón, de los compuestos evaluados. Se muestran los promedios \pm desviación estándar de 3 repeticiones independientes, obtenidos para cada método (MTT y Trypan blue). Se enmarcan las concentraciones menos tóxicas, que sirvieron como referencia para elegir la concentración de tratamiento.

	Schkuhrin I			Schkuhrin II			Anfotericina B		
	CC₁₀	CC₅₀	CC₉₀	CC₁₀	CC₅₀	CC₉₀	CC₁₀	CC₅₀	CC₉₀
	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
MTT	12.64 ± 0.75	16.03 ± 0.42	19.42 ± 0.24	4.54 ± 0.77	6.62 ± 0.43	8.70 ± 0.10	3.87 ± 0.40	6.72 ± 0.26	9.57 ± 0.17
Trypan blue	5.71 ± 3.76	12.30 ± 2.23	18.90 ± 0.71	3.96 ± 1.67	6.29 ± 0.94	8.62 ± 0.21	1.51 ± 0.38	5.59 ± 0.40	9.68 ± 1.12

4.3. EXPRESIÓN GÉNICA

Las eficiencias del PCR determinadas para cada gen se muestran en la tabla 6. Se puede apreciar que todas se encuentran dentro del rango admisible de 90-110%, considerado desde antes del experimento.

Tabla 6. Eficiencias del PCR para los 6 genes estudiados. Se muestra también el % de eficiencia tomado como óptima (100%) una eficiencia de 2.

	Eficiencia	% Eficiencia
<i>Actb</i>	1.91	95.7
<i>Hprt</i>	2.12	106.0
<i>Clec7a</i>	2.17	108.5
<i>Mrc1</i>	2.04	102.2
<i>Cd36</i>	2.06	102.9
<i>Pparg</i>	1.97	98.6

El cambio respecto al grupo control sin tratamiento de los niveles de expresión génica relativa normalizados (FC, *fold-change*) de los genes *Clec7a*, *Mrc1*, *Cd36* y *Pparg* se muestra en la Tabla 7 y la Figura 9.

Se escogió un FC de 2 o -2 veces el control como punto de corte, acompañado del p-value obtenido luego del análisis estadístico, para decidir si existe o no un cambio biológicamente relevante en la expresión del gen evaluado.

Se puede notar que la expresión de los genes *Pparg* y *Clec7a* es cercana a $FC= 1$ respecto al grupo sin tratamiento. Excepto en *Pparg* para los macrófagos tratados con schkuhrin I a $1 \mu\text{M}$, donde se obtiene un valor de $FC= -3$, no significativo estadísticamente.

En el caso de MR se observa una tendencia a la regulación negativa de su expresión por parte de todos los compuestos, siendo sólo estadísticamente significativos los valores obtenidos con ambos compuestos (schkuhrin I y II) a $0.1 \mu\text{M}$, y el más relevante el de $FC= -2.8$ obtenido con schkuhrin I a $0.1 \mu\text{M}$. Se observa además que se guarda cierta relación inversa dosis-respuesta, pues al reducirse la dosis, también se observa una mayor desregulación del gen.

Finalmente, se observa una notoria tendencia al aumento de la expresión de *Cd36* luego del tratamiento de los macrófagos con ambos compuestos (schkuhrin I y II), la cual aparentemente depende en forma directa de la concentración de los compuestos, pues disminuye al pasar de una concentración de $1 \mu\text{M}$ a la de $0.1 \mu\text{M}$. Se hace especial énfasis para el caso de schkuhrin II a $0.1 \mu\text{M}$ con el que se obtiene una sobreexpresión significativa de 6 veces más que los macrófagos sin tratamiento. También cabe resaltar la sobreexpresión obtenida con schkuhrin I a $1 \mu\text{M}$, con un valor de $FC= 2.8$ y con un p-value menor a 0.005. Para este gen también se obtuvo una marcada sobreexpresión estadísticamente significativa de $FC= 32$ y $FC= 92$ para SKI y SKII, respectivamente, luego del tratamiento de

los MPR con ambos compuestos a la concentración más tóxica de 5 μ M (Tabla 8).

Tabla 7. FC para cada gen, de los macrófagos tratados con los compuestos Rosiglitazona (Rosi) 5 μ M, SKI y SKII (a 1 y 0.1 μ M); respecto a los macrófagos sin tratamiento. Se muestra también el p-value obtenido mediante una prueba t. Se resaltan los p-value < 0.05.

Gen		5 μ M	1 μ M		0.1 μ M	
		Rosi	SKI	SKII	SKI	SKII
<i>Pparg</i>	FC	1.10	-2.99	1.07	1.02	-1.12
	<i>p-value</i>	0.48	0.15	0.21	0.70	0.41
<i>Mrc1</i>	FC	-1.48	-1.70	-1.15	-2.80	-1.60
	<i>p-value</i>	0.08	0.09	0.25	0.02	0.03
<i>Clec7a</i>	FC	1.13	-1.11	-1.49	-1.19	1.34
	<i>p-value</i>	0.32	0.11	0.07	0.50	0.25
<i>Cd36</i>	FC	1.44	2.80	6.00	1.33	2.05
	<i>p-value</i>	0.06	0.003	0.01	0.76	0.01

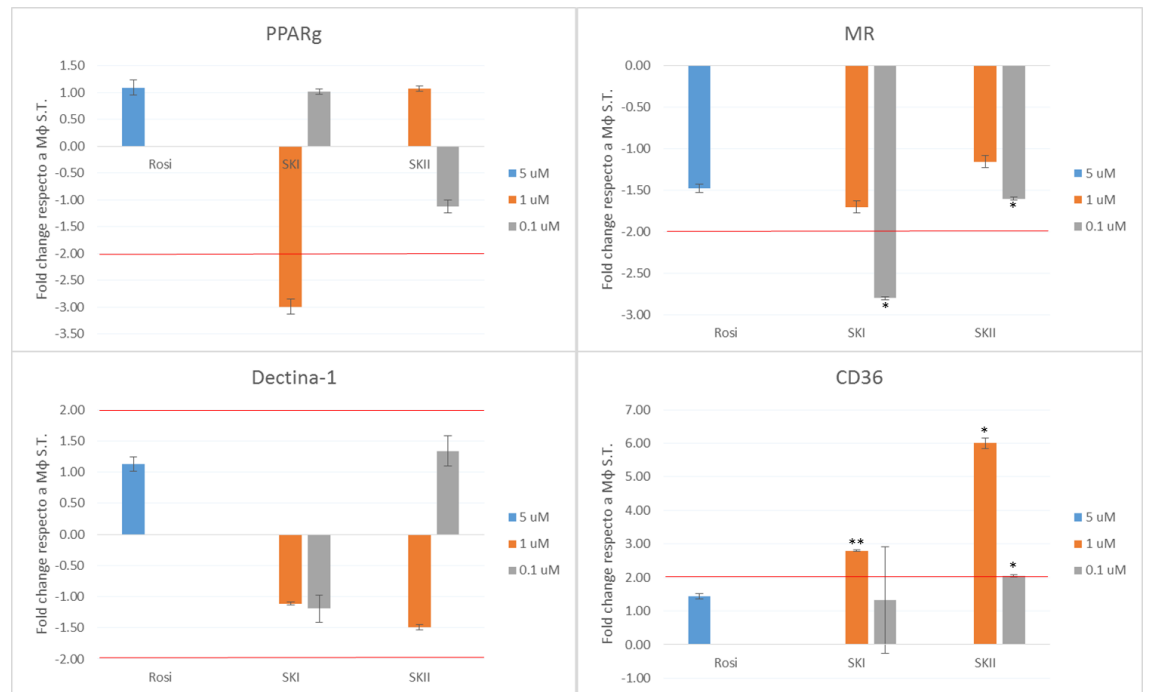


Figura 9. Niveles de expresión génica normalizada relativa al grupo de macrófagos control sin tratamiento, para los genes codificantes para PPAR γ , MR, Dectina-1 y CD36. Se muestran los grupos de macrófagos tratados con rosiglitazona (Rosi) 5 μ M, schkuhrin I (SKI) y schkuhrin II (SKII) 1 y 0.1 μ M. Media \pm D.E. de 2 experimentos independientes con 3 réplicas técnicas cada uno. *(p<0.05). **(p<0.005), comparado al control sin tratamiento.

Tabla 8. FC para cada gen, de los macrófagos tratados con los compuestos Rosiglitazona, SKI y SKII 5 μM ; respecto a los macrófagos sin tratamiento. Se muestra también el p-value obtenido mediante una prueba t. Se resaltan los p-value < 0.05 .

Gen		5 μM		
		Rosi	SKI	SKII
<i>Pparg</i>	FC	1.10	2.00	3.50
	<i>p-value</i>	0.48	0.07	0.03
<i>Mrc1</i>	FC	-1.48	-3.50	-4.00
	<i>p-value</i>	0.08	0.26	0.24
<i>Clec7a</i>	FC	1.13	-1.02	1.06
	<i>p-value</i>	0.32	0.51	0.43
<i>Cd36</i>	FC	1.44	32.00	92.00
	<i>p-value</i>	0.06	0.03	0.02

4.4. MEDICIÓN DE SUPERÓXIDO

4.4.1. Optimización de las condiciones de medición

Antes de probar el efecto de los compuestos, se empezó optimizando las condiciones del experimento usando los estímulos (PMA y parásitos) en los macrófagos control sin tratamiento. La producción de superóxido por parte de dichos macrófagos, monitoreada a los tiempos de 15, 30, 60, 90 y 120 minutos luego de agregado el estímulo (PMA o parásitos), se muestra en la Figura 10. En la parte a) se observa que al estimular a los macrófagos con PMA, la absorbancia alcanza un máximo a los 60 minutos y luego decae, mientras que al estimularlos con los parásitos aumenta hasta los 90 min. En dicho experimento se observó la desaparición rápida del color

luego de agregado el DMSO a los tiempos de 90 y 120 min, mientras que a los tiempos menores se mantuvo. Dos días después el color había desaparecido y se pensó que agregando más DMSO se podría disolver mejor el formazán formado para así recuperarlo, por lo que se agregó 60 μL más de DMSO con lo que se volvió a disolver el formazán observándose además que el color en todos los pozos se mantuvo. Se volvió a leer la placa y se observó que esta vez hubo un máximo de absorbancia a 90 min para el estímulo con PMA y a 60 min para el estímulo con parásitos (Figura 10b).

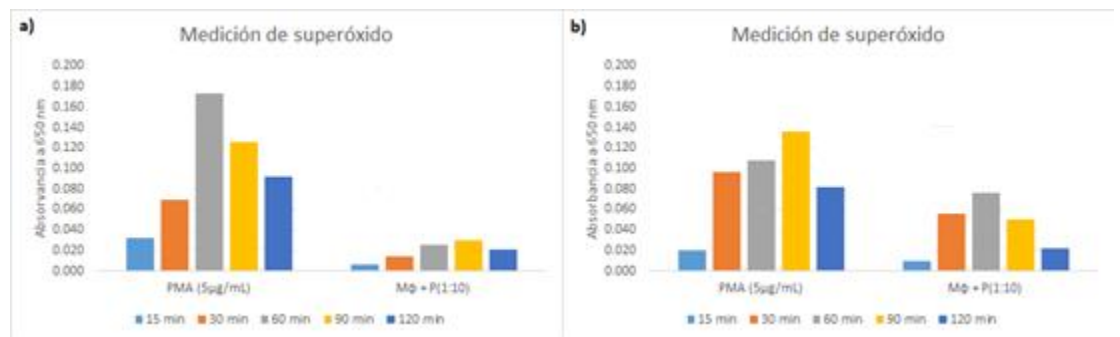


Figura 10. Absorbancias a 650 nm producidas por el formazán formado, para macrófagos estimulados con PMA ($M\phi + PMA$) y con parásitos en proporción 1:10 ($M\phi + P(1:10)$), sustraídas de la respectiva absorbancia del blanco (medio de cultivo con NBT). Se muestran mediciones para tiempos de 15, 30, 60, 90 y 120 min después de agregado el estímulo. (a) Formazán disuelto con 80 μL de DMSO. (b) Misma placa leída luego de dos días agregando 60 μL adicionales de DMSO.

Se decidió repetir esta vez probando dos proporciones de macrófagos:parásitos, 1:10 y 1:20, y diluyendo el formazán formado con 140 μ L de DMSO. Los resultados se muestran en la figura 11. En ella se observa que se tiene una mayor absorbancia a los 60 min para los macrófagos estimulados con parásitos 1:20, por lo que se decidió medir a este tiempo para el experimento empleando macrófagos con tratamiento. Las absorbancias para los tiempos superiores a 60 min salieron demasiado altas y se coloreó incluso los controles sin macrófagos (valores no mostrados), por lo que se decidió descartar dichos tiempos.

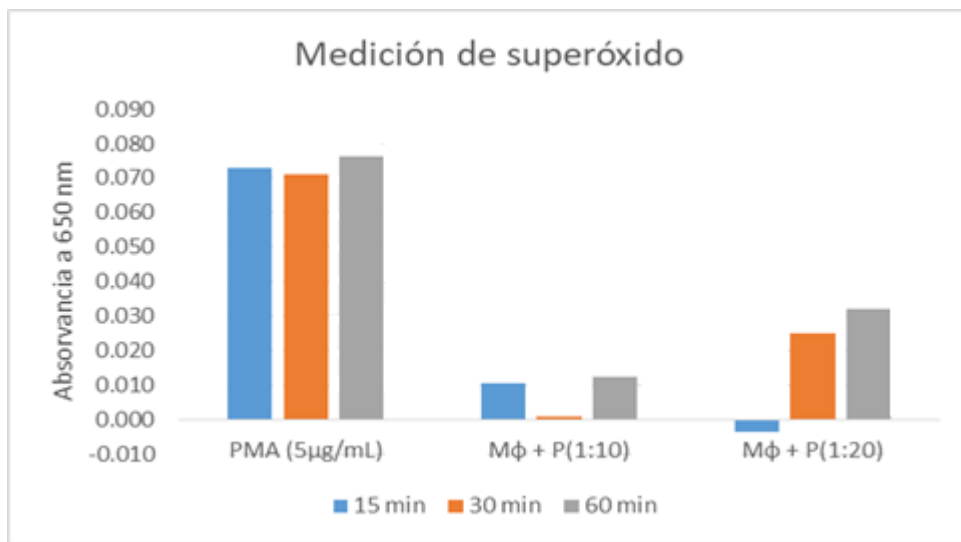


Figura 11. Absorbancias a 650 nm producidas por el formazán formado, para macrófagos estimulados con PMA (M ϕ + PMA) y con parásitos en proporción 1:10 (M ϕ + P(1:10)) y 1:20 (M ϕ + P(1:20)), sustraídas de la respectiva absorbancia del blanco (medio de cultivo con NBT). Se muestran mediciones para tiempos de 15, 30 y 60 min después de agregado el estímulo.

4.4.2. Medición luego del tratamiento

Luego de la optimización, se procedió al tratamiento de los macrófagos. En la figura 12 se muestran las absorbancias obtenidas para los macrófagos tratados y sin tratamiento, con ambos estímulos (PMA y parásitos). Se puede notar que hay una ligera variación en la medición dentro del grupo de macrófagos sin estímulo, por lo que se decidió calcular la proporción entre las absorbancias de estos y las de los macrófagos estimulados, para poder observar sólo las diferencias debidas a la producción de superóxido por efecto del estímulo. Los resultados de dicha proporción se muestran graficados en la figura 13. Se pueden observar ligeras diferencias a simple vista para el estímulo con PMA en los grupos de macrófagos tratados, en comparación con el control sin tratamiento; sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas entre los macrófagos estimulados con parásitos frente a los macrófagos sin estímulo.

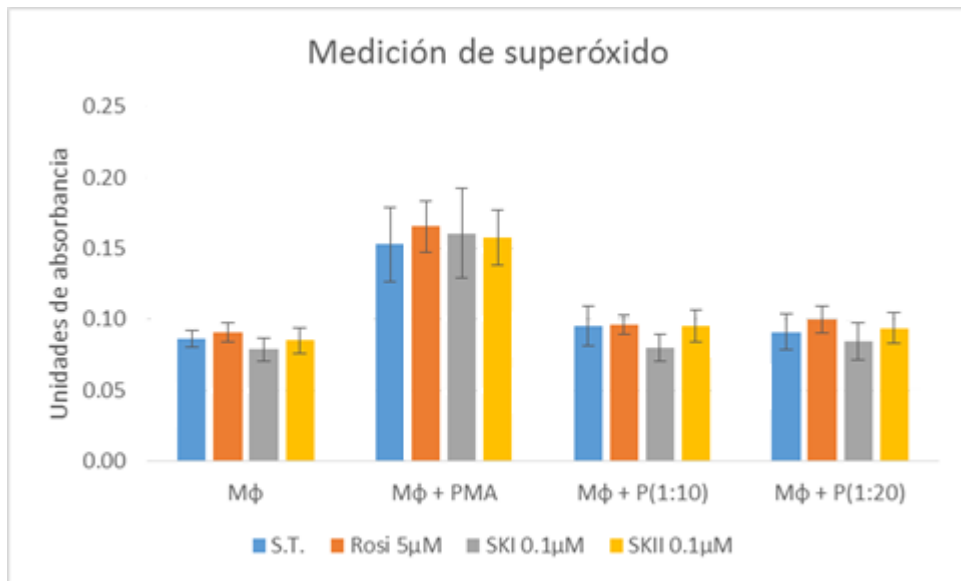


Figura 12. Absorbancias a 650 nm producidas por el formazán formado, para macrófagos estimulados con PMA (Mφ + PMA), con parásitos en proporción 1:10 y 1:20 (Mφ + P(1:10) y Mφ + P(1:20), respectivamente) y sin estímulo (Mφ). Se muestran los 4 grupos de macrófagos evaluados: sin tratamiento (S.T.) y tratados con rosiglitazona 5 μM (Rosi 5μM), schkuhrin I 0.1 μM (SKI 0.1μM) y schkuhrin II 0.1 μM (SKII 0.1μM). Media ± I.C. 95% de 3 experimentos independientes.

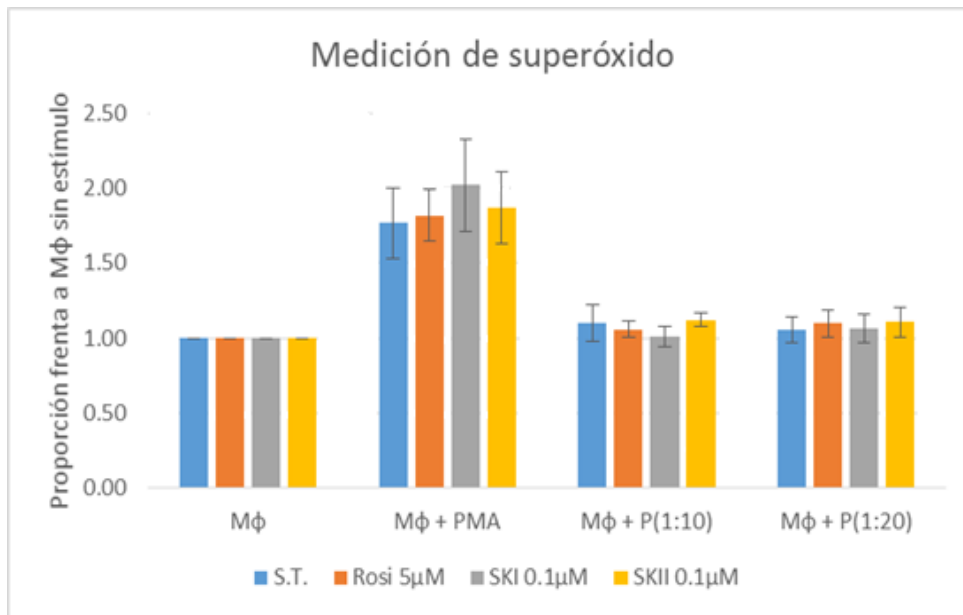


Figura 13. Proporción de absorbancias entre macrófagos estimulados con PMA (M ϕ + PMA) y con parásitos en proporción 1:10 y 1:20 (M ϕ + P(1:10) y M ϕ + P(1:20), respectivamente) frente a macrófagos sin estímulo (M ϕ). Para macrófagos sin tratamiento (S.T.) y tratados con rosiglitazona 5 μ M (Rosi 5 μ M), schkuhrin I 0.1 μ M (SKI 0.1 μ M) y schkuhrin II 0.1 μ M (SKII 0.1 μ M). Media \pm I.C. 95% de 3 experimentos independientes.

4.5. FAGOCITOSIS DE *Leishmania infantum*

4.5.1. Optimización del tiempo de infección

Para determinar un adecuado tiempo de infección de macrófagos peritoneales murinos para la evaluación de la fagocitosis, se enfrentó a macrófagos (sin tratamiento) con parásitos de *L. infantum* (ratio de infección 1:10, respectivamente) en un rango de tiempo de 30 a 210 min. En cada punto de tiempo evaluado se contó el número de parásitos observados dentro de los macrófagos y de macrófagos infectados. Los resultados se muestran en la Figura 14. Se puede observar que la fagocitosis (expresada tanto como el número promedio de parásitos observados dentro de los macrófagos, porcentaje de macrófagos infectados, o índice de fagocitosis) aumentó proporcionalmente al tiempo de enfrentamiento.

Para poder observar un cambio en la fagocitosis de los parásitos luego del tratamiento con los compuestos, se decidió escoger un tiempo en el que la fagocitosis se encuentre en un punto intermedio (ni muy alta ni muy baja), en el rango cubierto. Por lo que se escogió el tiempo de 120 minutos, en el que el índice de fagocitosis fue de 193, para dicha evaluación.

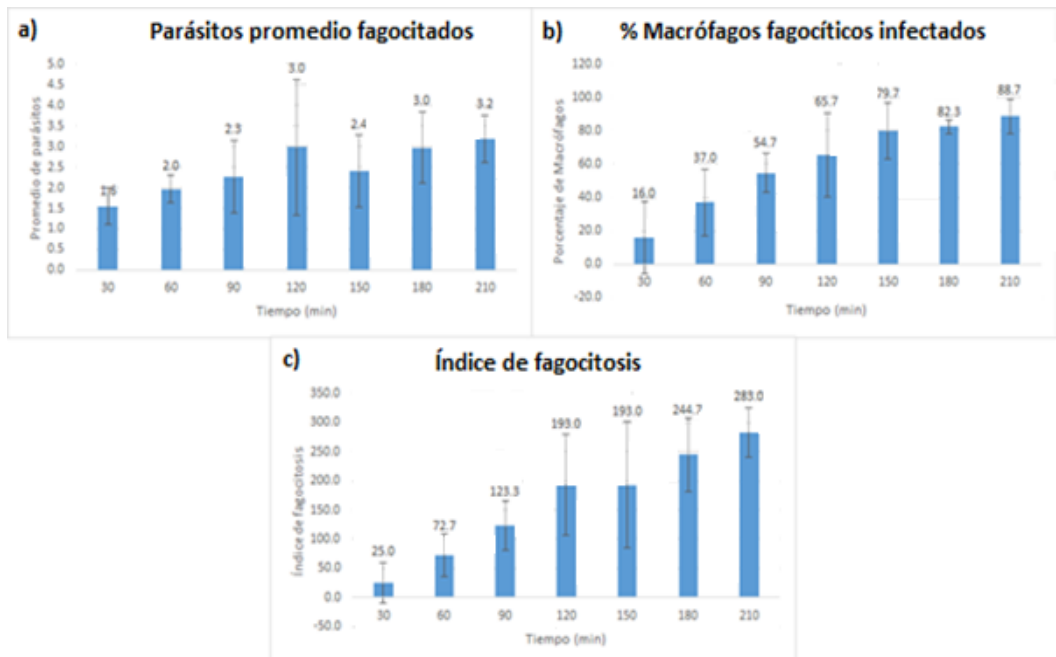


Figura 14. Evolución de la fagocitosis de *L. infantum* por macrófagos sin tratamiento para un rango de tiempo de 30 a 210 minutos luego del enfrentamiento, y para una tasa de infección de 1:10 macrófago:parásitos. a) Número promedio de parásitos fagocitados por macrófago. b) Porcentaje de macrófagos infectados albergando al menos 1 parásito fagocitado. c) Índice de fagocitosis (axb)= parásitos promedio x % macrófagos fagocíticos infectados. Se muestra la media \pm I.C. 95% de tres repeticiones independientes.

4.5.2. Infección de macrófagos tratados

Luego del enfrentamiento con *L. infantum* de los macrófagos tratados con los compuestos a dos concentraciones (1 y 0.1 μM), se observaron los resultados mostrados en la Figura 15. El único valor que mostró cierta tendencia relativamente más notable hacia una reducción en el índice de fagocitosis correspondió al del enfrentamiento de los macrófagos tratados con schkuhrin I a 0.1 μM , cuyo índice de fagocitosis ($I= 137$) resultó menor al de los macrófagos sin tratamiento ($I= 187.7$). Dicho efecto, como se puede observar en la figura, fue influenciado por el promedio de parásitos fagocitados por los macrófagos (con una diferencia de 0.8), más no por el porcentaje de macrófagos albergando parásitos fagocitados, el cual resultó muy similar. Sin embargo, se puede notar claramente que los I.C. 95% de ambos grupos de macrófagos se superponen, lo cual indica falta de significación estadística para la diferencia entre sus medias.

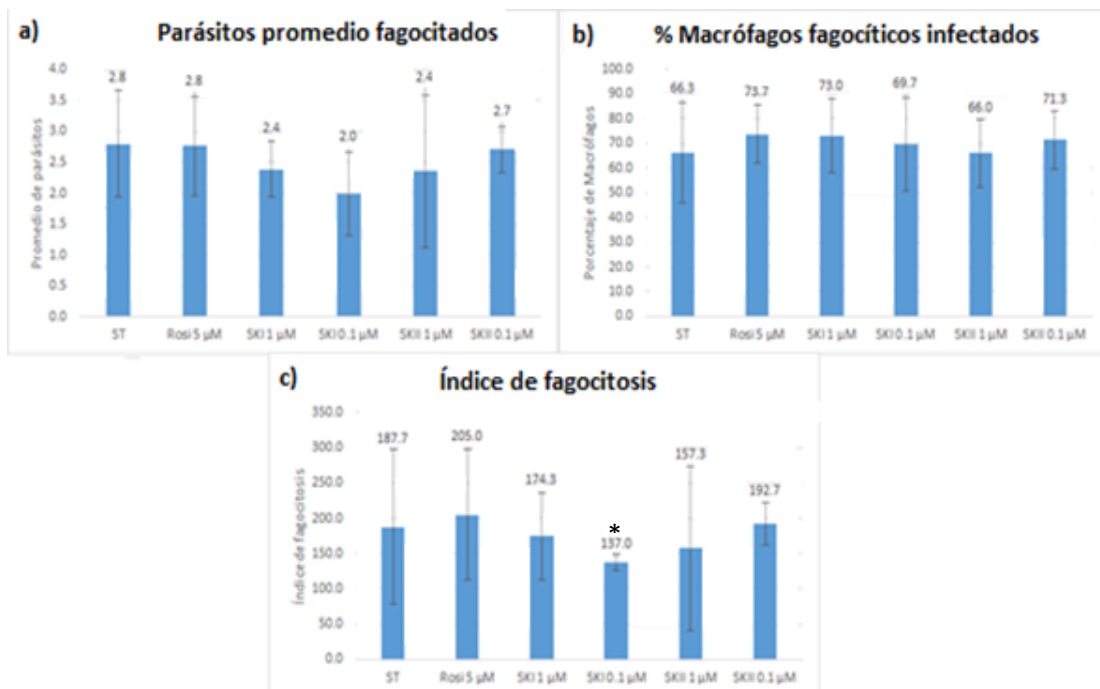


Figura 15. Fagocitosis de *L. infantum* por macrófagos sin tratamiento (ST), tratados con rosiglitazona (Rosi) 5 μ M, schkuhria I (SKI) 1 μ M y 0.1 μ M, y schkuhria II 1 μ M y 0.1 μ M. a) Número promedio de parásitos fagocitados por macrófago. b) Porcentaje de macrófagos infectados albergando al menos 1 parásito fagocitado. c) Índice de fagocitosis (axb)= parásitos promedio x % macrófagos fagocíticos infectados. Se muestra la media \pm I.C. 95% de tres repeticiones independientes. *(p<0.05).

V. DISCUSIÓN

5.1. OBTENCIÓN DE COMPUESTOS

Según los resultados obtenidos, y luego de comparar las cantidades relativas de las fracciones obtenidas de ambos extractos luego de la separación (tablas 3 y 4), se puede notar cierta similitud entre ellos. Comenzando por el hecho de haber obtenido el mismo número de fracciones y que además el perfil de TLC de éstas en el mismo sistema de solventes es similar (figura 8). Este hecho podría indicar que la extracción de la planta con DCM fue incompleta, y que parte de los compuestos que debieron haberse extraído con dicho solvente también se extrajeron luego con la mezcla DCM/MeOH (1 : 1); incluidos los compuestos buscados, schkuhrin I y schkuhrin II. Lo cual podría haber ocurrido porque esta última mezcla contiene también DCM, resaltando además que se realizaron dos extracciones seguidas con ella.

Para evitar la extracción incompleta con el primer solvente, podría haberse realizado una extracción adicional con 1 L del solvente DCM, o haberlo dejado por más tiempo en maceración. Dicho proceso no se realizó, porque se esperaba que los compuestos de interés se encuentren (al menos en mayor cantidad) en el extracto DCM/MeOH, pues es lo que se indicaba en el trabajo de Mokoka *et al.* (Mokoka et al., 2013). Posiblemente dichos compuestos se encontraron en mayor cantidad en el primer extracto (el extracto DCM), debido al tiempo de maceración de 48 horas que se le dio. Mokoka *et al.* (2013) no indican el tipo de extracción que realizaron, ni el tiempo en el que el material vegetal estuvo en contacto con el solvente. Sin embargo, este

hecho no impidió lograr obtener los compuestos que se estaban buscando, por lo que no resultó ser un problema.

El sistema de solventes que se usó para realizar la MPLC permitió obtener a los compuestos buscados con una pureza tal que se requirió sólo una etapa de purificación para alcanzar purezas mayores al 80% y 90% para schkuhrin I y schkuhrin II, respectivamente. Los solventes que Mokoka y col. utilizaron para el respectivo fraccionamiento del extracto fueron hexano (Hex), acetato de etilo (EtOAc) y metanol (MeOH), en las proporciones mostradas en la tabla 9.

Tabla 9. Sistema de solventes empleados en la separación por MPLC, en el presente trabajo y por Mokoka y col. (Mokoka et al., 2013).

	Propio	Mokoka y col.
1°	EP/EtOAc (1:1)	Hexano (Hex)/EtOAc (1 : 1)
2°	EtOAc	Hex/EtOAc (4 : 6)
3°	EtOAc/MeOH (9.8:0.2)	EtOAc
4°	EtOAc/MeOH (9.5:0.5)	EtOAc/MeOH (7 : 3)
5°	EtOAc/MeOH (9:1)	-

Se puede notar que la polaridad al pasar de un sistema de solventes a otro durante la MPLC realizada por Mokoka y col., varía de forma más drástica o menos progresiva que en la MPLC realizada en el presente trabajo; especialmente luego del 3^{er} solvente, EtOAc (que es a partir del cual empezaron a salir de la columna los compuestos buscados). De esta forma, se entiende que pudo haberse logrado una mejor separación entre los compuestos deseados y no deseados presentes en la planta, porque estos fueron arrastrados por la columna de una forma más progresiva, teniendo a su vez mayor tiempo para interactuar con la sílica gel y poder separarse mejor. Lo mencionado podría ser el motivo por el que no se requirió realizar la posterior purificación por HPLC semipreparativa que realizaron Mokoka y col., y que sólo bastó una purificación por SPE para obtener los compuestos en las purezas indicadas anteriormente.

Según lo observado, se concluiría que una forma en la que se podría mejorar la extracción de los compuestos sería realizar una primera maceración con un solvente apolar, como por ejemplo éter de petróleo, para poder librarse de las grasas y otros compuestos muy poco polares. Luego, como se mencionó, realizar dos maceraciones seguidas de 48 horas cada una con DCM, para tratar de que, en lo posible, la cantidad total de los compuestos de interés sean extraídos con este solvente, y de esta manera poder mejorar la eficiencia de la extracción.

5.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS

Resumiendo los resultados de expresión génica obtenidos para los genes *Clec7a* y *Mrc1*, cuyos productos de proteína (dectina-1 y receptor de manosa) están involucrados en el reconocimiento de *L.infantum* por los macrófagos, se puede notar que su expresión no fue modificada positivamente como se esperaba tras el tratamiento con los compuestos SKI y SKII. Ello contrasta con lo que se observó en los trabajos de otros grupos, donde diferentes compuestos con grupos aceptores de Michael en su estructura activan PPAR γ (Mimche, Thompson, Taramelli, & Vivas, 2012) y promueven la expresión de dichos receptores (Cabanillas et al., 2014; Le Lamer et al., 2014). Incluso el compuesto rosiglitazona no tuvo un efecto importante a resaltar (obteniéndose FC de sólo 1.1 y una reducción de 1.5, para los genes *Clec7a* y *Mrc1*, respectivamente). Dichos resultados inesperados podrían haberse dado a causa de al menos dos posibles factores. El primero es que las cepas de ratones, de las cuales se extrajeron los macrófagos, usadas en este trabajo difieren de las empleadas en los otros grupos. Tan sólo comparando la expresión inducida por rosiglitazona 5 μ M se encuentra que, en el grupo de Cabanillas (Cabanillas et al., 2014) se obtuvo un aumento en la expresión de 1.8 veces más respecto al control para los genes *Clec7a* y *Mrc1*, utilizando macrófagos derivados de monocitos humanos; en el grupo de Galès (Galès et al., 2010) se obtuvo un aumento de 6 veces más respecto al control para el gen *Clec7a*, usando macrófagos extraídos de ratones C57BL/6J; en el grupo de Coste (Coste et al., 2003) se obtuvo un aumento de 7.3 veces más respecto

al control para el gen *Mrc1*, usando macrófagos extraídos de ratones Swiss; mientras que en el grupo de Le Lamer (Le Lamer et al., 2014) se obtuvo un aumento de 4.3 y 5 para los genes *Clec7a* y *Mrc1*, respectivamente, usando macrófagos extraídos de ratones de cepa no especificada. Como se puede notar, en todos los casos se obtienen valores diferentes de expresión de ambos genes. Por lo cual, se deduce que el cambio de expresión en dichos genes ocasionado por una activación de PPAR γ , no es constante en macrófagos de diferentes cepas de ratones (y en humanos). Sin embargo, quizá podría hacerse una normalización intercepas de ratones para realizar comparaciones más exactas. Adicional a todo ello, se debe tener en cuenta que las diferentes condiciones de los estudios también pueden alterar los resultados obtenidos, por lo que cualquier comparación debe ser realizada con precaución. De todos modos, teniendo la mencionada variación inter-cepas (y especies) en consideración, se recomendaría, para futuros estudios, realizar los experimentos en macrófagos provenientes de más de una cepa de ratón, para poder comparar los posibles diferentes efectos a obtener, y previamente comparar los niveles de expresión de *Pparg* en los diferentes macrófagos estudiados para poder establecer una relación entre ambos resultados.

En el presente trabajo se utilizaron ratones BALB/c (debido a su conocida susceptibilidad a la infección con ciertas especies de *Leishmania* (Blackwell, Roberts, & Alexander, 1985)), lo cual puede explicar los resultados distintos obtenidos. Cabe notar que en todos los experimentos de expresión génica, siempre se obtuvo valores altos de C_q para el gen *Pparg* ($C_q > 40$), lo cual sería

un indicador de su baja expresión en los MPR tanto tratados como no tratados provenientes de los ratones BALB/c aquí estudiados. Coste *et al.* indican que para el caso de macrófagos RAW 264.7, que expresan muy bajos niveles de ARNm de PPAR γ , el tratamiento tanto con ligandos de PPAR γ como con IL-13 no tiene efecto en la expresión del gen *Mrc1* hasta que son transfectados con un plásmido que expresa PPAR γ , que es cuando sí se observa un aumento en la expresión de dicho gen (Coste et al., 2003). Por lo tanto, se puede pensar también que la ausencia de alteración de la expresión del gen *Clec7a* observada en el presente trabajo puede estar relacionada a la baja expresión de *Pparg*.

Para el segundo factor se debe notar que diferentes compuestos y tipos de compuestos activadores de PPAR γ provocan una respuesta diferente (Atanasov et al., 2013; Lin, 2012; Zou et al., 2008) incluso siendo de la misma familia de compuestos como en el caso de las tiazolidinedionas (Yki-Järvinen et al., 2016). En el trabajo de Lin y col. (Lin, 2012) se observa cómo lactonas sesquiterpénicas (compuestos con grupos aceptores de Michael), pueden unirse y activar PPAR γ sin formar enlace covalente con él y de forma no dependiente del grupo aceptor de Michael. Se entiende que los compuestos SKI y SKII también podrían estarse uniendo a PPAR γ de forma covalente o no covalente con una orientación dentro del LBD de dicho receptor nuclear desconocida; y, al tener un plegamiento que depende del modo de unión y orientación del ligando para reclutar a una u otra molécula co-activadora (Lin, 2012; Yu & Reddy, 2007), se hace de cierta forma impredecible el efecto

final, y la magnitud de éste, a causa de una activación de PPAR γ con uno u otro ligando.

En vista que se observó la reducción de la expresión de *Mrc1* (con SKI a 0.1 μ M) –gen codificante para el receptor de manosa– se esperaba algún cambio en la producción de ROS o en la fagocitosis de *L. infantum*, pues como se mencionó anteriormente dicho receptor también permite la fagocitosis de *Leishmania* y participa en una ruta de señalización hacia la mejora de la producción de ROS (Lefèvre et al., 2013). Sin embargo, sólo se observó una ligera variación en la fagocitosis luego del tratamiento con SKI a 0.1 μ M, pero en donde los valores de I.C. 95% de dicho grupo comparado con el control sin tratamiento se traslapan, lo cual, considerando por el contrario el valor de p (<0.05), indica que no hay diferencia estadísticamente significativa con los datos con los que se cuenta. Por otro lado, tampoco se observó algún efecto en la producción de superóxido a causa de algún tratamiento. Esto último fue corroborado al estimular a los macrófagos con parásitos de *L. amazonensis* (no hubo un efecto significativo en la producción de superóxido, anexo 3). Todo lo anterior lleva a pensar en las siguientes causas:

Al estar ambos receptores Dectina-1 y MR relacionados con la producción de ROS a través de las vías Dectina-1-Syk-p47phox y MR-AA-NADPH oxidasa (Lefèvre et al., 2013) y no sólo MR, es comprensible, de acuerdo a los resultados de expresión génica obtenidos, que no se haya observado una alteración respecto al control en la producción de superóxido por parte de los

macrófagos al ser enfrentados con *L. infantum* luego de tratarlos con los compuestos. Pues, a pesar de que SKI haya disminuido la expresión de *Mrc1*, ninguno de los dos compuestos (SKI ni SKII) provocó un cambio significativo en la expresión de *Clec7a*. Más aún, en el trabajo de Lefèvre *et al.* (Lefèvre *et al.*, 2013) se observa que la producción de ácido araquidónico (AA, el cual promueve la interacción entre las subunidades p47phox, p67phox y flavocitocromo b, para el ensamblaje de la NADPH oxidasa (Lefèvre *et al.*, 2013)) luego del enfrentamiento con *L. infantum* es menor respecto al control pero en macrófagos provenientes de ratones condicionalmente deficientes de MR (*Mrc1*^{-/-}). En la presente investigación el gen codificante para dicho receptor se encontró expresado en un nivel que sugiere una baja abundancia del ARNm (y por tanto, una baja expresión) de *Mrc1*; sin embargo, sigue siendo expresado en los macrófagos. Por lo tanto, en este escenario, se entiende que de existir alguna posible alteración de la producción de ROS a causa de la ligera reducción de la expresión de *Mrc1*, ésta sería demasiado pequeña como para poder detectarla con la técnica utilizada. Por otro lado, también se conoce que la activación de PPAR γ con glitazonas, LDL oxidado (Chinetti, Fruchart, & Staels, 2003) u óxido nítrico (von Knethen & Brune, 2002) puede atenuar el estallido respiratorio de los macrófagos por medio de una desregulación de la subunidad p47phox de la NADPH oxidasa. Efecto que, de darse una activación de PPAR γ , quizá se contrarrestaría con un posible aumento de fosforilación de la misma subunidad generado por unión de *L. infantum* con Dectina-1 (cuyo gen no

sufrió ningún cambio de expresión tras el tratamiento con los compuestos evaluados) por la vía anteriormente señalada. Ello también podría explicar la no observada alteración en la producción de ROS, frente a un escenario de activación de PPAR γ por los compuestos (SKI y/o SKII).

Como punto aparte, cabe resaltar que, como se puede observar en la figura 13, los macrófagos no están produciendo una abundante cantidad de superóxido al ser estimulados con parásitos. Lo cual podría indicar que, por alguna razón, no están siendo lo suficientemente estimulados por *L. infantum* (o *L. amazonensis*), o que no se encuentran al máximo de su capacidad productora de ROS; por lo que no estarían respondiendo adecuadamente a un efecto de tratamiento y por lo tanto impidiendo un adecuado estudio de producción de ROS en ellos.

En cuanto a la fagocitosis, la única observación relevante es la ligera reducción del índice de fagocitosis respecto al control que se dio luego del tratamiento con schkuhrin I a 0.1 μ M, sin embargo, como se mencionó anteriormente, no resultó ser estadísticamente significativa para los datos con los que se cuenta. De haberlo sido, este hallazgo guardaría relación con los resultados de expresión génica, pues la más notoria reducción de la expresión de *Mrc1* (2.8 veces menos que el control) ocurrió también con dicho compuesto a la misma concentración.

En un estudio realizado por Rajaram *et al.* (Rajaram et al., 2010) sobre macrófagos alveolares humanos, los autores muestran que el enfrentamiento de aquellos macrófagos con *Mycobacterium tuberculosis* induce la activación

de *Pparg* por medio de una unión de dicho parásito con el MR, a través de una vía de activación constituida por: MR – MAPK-p38 – cPLA₂ – AA – COX₂ – PGH₂ – 15-*d*-PGJ₂ – PPAR γ ; y también induce la expresión de *Pparg* a través de una vía adicional no especificada dependiente de MR. Dichos resultados concuerdan con la relación de MR-AA mostrada por Lefèvre *et al.* (Lefèvre et al., 2013). Entonces, según la mencionada vía, podría ocurrir una activación de PPAR γ al enfrentar a los macrófagos con los parásitos, para lo cual en el presente trabajo se esperaría que en los casos en los que se observe una mayor reducción de la expresión del gen *Mrc1*, también se tenga una menor activación de PPAR γ .

Observando los datos de sobreexpresión del gen *Cd36* (blanco directo de activación de PPAR γ (Mimche et al., 2012)), en los cuales su mayor sobreexpresión se da para los tratamientos con SKII (FC de 6.00 y 2.05 para 1 y 0.1 μ M, respectivamente), se ve cierta relación con el grado de reducción de la expresión del gen *Mrc1* que provoca uno u otro tratamiento. Es decir, para una menor reducción de expresión del gen *Mrc1* (por ej. la provocada por SKII a comparación de la de SKI) se observa un mayor aumento en la expresión del gen *Cd36*. Sin embargo, se debe notar que los macrófagos no fueron enfrentados con los parásitos para los experimentos de expresión génica, y que, por tanto, dicha relación podría estarse dando por algún motivo desconocido.

La relación mostrada se contradice para los resultados de expresión génica obtenidos luego del tratamiento con los compuestos a 5 μ M, pues se obtiene

una mayor reducción de la expresión del gen *Mrc1* y un mucho mayor aumento de la expresión del gen *Cd36*. Sin embargo, se debe notar que estos resultados fueron obtenidos bajo concentraciones más tóxicas tanto de los compuestos (SKI y SKII a 5 μ M) como de DMSO (0.5 %) (Agnès Coste, Agnès Auboy, IRD, comunicación personal, 29 de junio de 2017). Tomando en cuenta que CD36 es un receptor involucrado en el reconocimiento de células apoptóticas (Fadok, Warner, Bratton, & Henson, 1998; Greenberg et al., 2006), es posible que gran parte de la sobreexpresión mostrada por el gen *Cd36* se deba a la influencia de los macrófagos en estado de apoptosis presentes en el medio debido a la toxicidad de los compuestos y el DMSO a las mencionadas concentraciones.

Finalmente, según todos estos resultados obtenidos se puede concluir que ambos compuestos (SKI y SKII) no serían útiles para ser utilizados en algún posible tratamiento de inmunomodulación contra *L. infantum*.

En cuanto a la expresión de *Cd36*, también se observa una diferencia en el aumento de expresión inducido por el tratamiento de macrófagos con rosiglitazona 5 μ M, reportado por diferentes autores. En el trabajo de Cabanillas y col. (Cabanillas et al., 2014) se reporta un aumento de expresión de 1.7 veces el control tratando macrófagos derivados de monocitos aislados de sangre periférica humana. Usando la línea celular monocítica THP-1 diferenciada con PMA, Mimche y col. (Mimche et al., 2012) se reportan un aumento de 5 veces el control. En el trabajo de Le Lamer y col. (Le Lamer et al., 2014) se reporta también un aumento de 5 veces más que el control

tratando macrófagos peritoneales de ratón. En el presente trabajo se obtuvo un aumento de expresión de 1.4 veces el control, resultado más parecido al de Cabanillas y col. a pesar de haberse realizado el tratamiento en macrófagos provenientes de humanos en aquel estudio.

El tratamiento con los compuestos dio resultados alentadores para el caso del gen *Cd36*, pues se llegó a obtener una expresión mayor a 2 veces el control con ambos compuestos (FC de 2.8 y 6 para schkuhrin I y schkuhrin II a 1 μ M, respectivamente; y de 2.1 para schkuhrin II a 0.1 μ M). Esto resulta interesante, pues en trabajos anteriores (Mimche et al., 2012; Oलगnier et al., 2011; Serghides et al., 2009) se vio que una modificación de la expresión de CD36 (tanto a nivel proteico como de ARNm) está relacionada con una mejora de la fagocitosis de eritrocitos parasitados con *Plasmodium falciparum* (*pfPE*). Serghides y col. reportaron que el tratamiento con rosiglitazona promueve una mejora de la expresión superficial de CD36 e incrementa la fagocitosis de *pfPE* mediada por dicho receptor (Serghides et al., 2009). En otro estudio se mostró que el compuesto curcumina mejora la expresión de CD36 tanto a nivel proteico como de ARNm y a su vez mejora también la fagocitosis de *pfPE* (Mimche et al., 2012). Sin embargo, se demuestra que ambas mejoras no están ligadas a una activación de PPAR γ , sino que más bien parecen estar relacionadas con una activación del factor de transcripción Nrf2. El grupo de Oलगnier y col. señala que la activación de Nrf2 puede promover la expresión de *Cd36* incluso en condiciones inflamatorias, en donde PPAR γ falla para dichos propósitos (Oलगnier et al.,

2011). Dichos autores muestran que el tratamiento con sulforafano (activador de Nrf2) de ratones infectados con *Plasmodium berghei* reduce la carga parasitaria respecto al grupo control. Teniendo en cuenta la demostrada implicación de la mejora de la expresión de CD36 (tanto a nivel proteico como de ARNm) hacia un posible tratamiento de la malaria, se esperaría que ambos compuestos, y en especial schkuhrin II, podrían ser útiles para futuras investigaciones en el campo de inmunomodulación contra dicha enfermedad.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados mostrados llevan a la conclusión de que los compuestos SKI y SKII no presentan un efecto inmunomodulador para un tratamiento contra *Leishmania infantum*, bajo las condiciones estudiadas.

VII. RECOMENDACIONES

Observando el aumento de expresión del gen *Cd36* por efecto del tratamiento con SKII (1 μ M), y los efectos demostrados anteriormente de dicho aumento en la acción sobre *Plasmodium falciparum*; se recomienda, para una futura investigación, evaluar su actividad inmunomoduladora frente al mencionado parásito. Adicionalmente, dentro del futuro estudio, se recomienda evaluar el efecto dosis-respuesta de los compuestos sobre la mejora de expresión de *Cd36*, para confirmar la relación vista en éste trabajo.

VIII. LIMITACIONES

El presente trabajo estuvo enfocado en observar la capacidad de los compuestos aislados para mejorar la acción antiparasitaria de los macrófagos frente a *L. infantum*. La cual se da por una mejora en la expresión de los PRRs MR y Dectina-1. Se indica además que esto podría deberse a una activación del PPAR γ , pero esto último no pudo demostrarse por completo, sino que se realizó el análisis de expresión de *Cd36* (adicional al de *Mrc1* y *Clec7a*) para verificar hasta cierto punto que esto sí podría estar ocurriendo, pues el gen que codifica para este receptor es también un blanco directo del PPAR γ . Sin embargo, la completa demostración de activación del PPAR γ requeriría mayor cantidad de experimentos como, por ejemplo: (1) transfectando a los macrófagos con el gen de luciferasa con el PPPE en su región promotora, lo cual permitiría saber de una activación según el cambio en la actividad de luciferasa relativa a un control sin tratamiento (Lin, 2012); (2) usando macrófagos de ratones *knockout* para el gen *Pparg* (PPAR $\gamma^{-/-}$), en los cuales un tratamiento con un compuesto activador de PPAR γ no tendría el efecto que sería medido al utilizar macrófagos de ratones *wild type* (Le Lamer et al., 2014); (3) usando antagonistas de PPAR γ junto con el virtual compuesto activador, lo cual reduciría notoriamente la activación de PPAR γ (Atanasov et al., 2013); etc. Todo lo mencionado podría dar lugar a todo un trabajo completo sólo para demostrar la unión y activación del PPAR γ por los compuestos aislados. Con el presente trabajo se evaluó directamente el efecto biológico esperado (mejora de la expresión de *Mrc1*, *Clec7a* y *Cd36*, de fagocitosis y de producción de ROS) que provocaría la activación de PPAR γ

por los compuestos aislados, por lo que se consideró que fue mejor comenzar por este punto antes de demostrar cualquier unión, pues los resultados que hubieran sido observados (pero que no ocurrieron), hubieran sido más cercanos a una posible futura aplicación como tratamiento contra la leishmaniasis.

Otra limitación es que el trabajo se realizó en un sistema *ex vivo*. Sin embargo, esto es necesario antes de pasar a un modelo *in vivo*, pues permite controlar mejor las variables a medir. En un sistema *in vivo*, por ejemplo, no se sabría si los compuestos están llegando en las concentraciones necesarias a las macrófagos o si están siendo rápidamente excretados, etc. Por lo que es un buen primer paso para saber si estos compuestos son capaces o no de ejercer una función inmunomoduladora. Otra limitante es el hecho de que es muy complicado saber el mecanismo por el cual los compuestos ingresan a la célula e incluso al núcleo; podría postularse que esto podría estarse dando por una difusión por membrana o un paso a través de transportadores de moléculas endógenas, lo cual es posible según indican Dobson y Kell (Kell & Dobson, 2008).

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, C. L., & Ugaz, O. L. De. (1990). *Revista de Química.*, *IV*, 115–121.
- Almela, M. C. (1961). *Schkuhria pinnata* (Lam .) O . Kuntze ; adventicia nueva para la Flora Española. Retrieved from [http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/anales/1961/Anales_18\(1\)_305_317.pdf](http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/anales/1961/Anales_18(1)_305_317.pdf)
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, *55*(1), 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Atanasov, A. G., Wang, J. N., Gu, S. P., Bu, J., Kramer, M. P., Baumgartner, L., ... Heiss, E. H. (2013). Honokiol: A non-adipogenic PPAR γ agonist from nature. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1830*(10), 4813–4819. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.021>
- Babior, B. M. (1984). Burst of Phagocytes. *Journal of Clinical Investigation*, *73*(March), 599–601. <https://doi.org/10.1172/JCI111249>
- Baranova, I. N., Kurlander, R., Bocharov, A. V., Vishnyakova, T. G., Chen, Z., Remaley, A. T., ... Eggerman, T. L. (2008). Role of Human CD36 in Bacterial Recognition, Phagocytosis, and Pathogen-Induced JNK-Mediated Signaling. *The Journal of Immunology*, *181*(10), 7147–7156. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.7147>
- Blackwell, J. M., Roberts, B., & Alexander, J. (1985). Response of BALB/c Mice to Leishmanial Infection. In M. Potter (Ed.), *Current Topics in Microbiology and*

- Immunology*. Berlin. https://doi.org/10.1007/978-3-642-70740-7_15
- Boelaert, M., & Sundar, S. (2014). Leishmaniasis. *Manson's Tropical Infectious Diseases*, 631–651.e4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5101-2.00048-0>
- Bohlmann, F., & Zdero, C. (1981). A heliangolide from *Schkuhria pinnata*. *Phytochemistry*, 20(10), 2431–2432. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82684-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82684-9)
- Bussmann, R. W., Sharon, D., P, D. D., & Barocio, Y. (2008). Peruvian plants canchalagua (*Schkuhria pinnata* (Lam .) Kuntze), hercampuri (*Gentianella alborosea* (Gilg .) Fabris), and corpus way (*Gentianella bicolor* (Wedd .) J . Pringle) prove to be effective in the treatment of acne. *Arnaldoa*, 15(1), 149–152.
- Cabanillas, B. J., Le Lamer, A. C., Olganier, D., Castillo, D., Arevalo, J., Valadeau, C., ... Fabre, N. (2014). Leishmanicidal compounds and potent PPAR γ activators from *Renealmia thyrsoides* (Ruiz & Pav.) Poepp. & Endl. *Journal of Ethnopharmacology*, 157, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.09.010>
- Calleri, E., Pochetti, G., Dossou, K. S. S., Laghezza, A., Montanari, R., Capelli, D., ... Moaddel, R. (2014). Resveratrol and its metabolites bind to PPARs. *ChemBioChem*, 15(8), 1154–1160. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300754>
- Caprio, V., & Williams, J. M. (2009). *Catalysis in asymmetric synthesis* (3rd ed.). John Wiley & Sons.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., ... Boelaert,

M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), S7–S16.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>

Chinetti, G., Fruchart, J. C., & Staels, B. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors: new targets for the pharmacological modulation of macrophage gene expression and function. *Curr Opin Lipidol*, 14(5), 459–468.

<https://doi.org/10.1097/01.mol.0000092630.86399.00>

Cho, N., & Momose, Y. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as insulin sensitizers: from the discovery to recent progress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(17), 1483–507.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/156802608786413474>

Coste, A., Dubourdeau, M., Linas, M. D., Cassaing, S., Lepert, J. C., Balard, P., ... Pipy, B. (2003). PPAR γ promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13.

Immunity, 19(3), 329–339. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00229-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00229-2)

Davis, A. J., Murray, H. W., & Handman, E. (2004). Drugs against leishmaniasis: A synergy of technology and partnerships. *Trends in Parasitology*, 20(2), 73–76.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.11.006>

De Groot, J. C., Weidner, C., Krausze, J., Kawamoto, K., Schroeder, F. C., Sauer, S., & Büssow, K. (2013). Structural characterization of amorfrutins bound to the peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Journal of Medicinal Chemistry*,

56(4), 1535–1543. <https://doi.org/10.1021/jm3013272>

Delmas, F., Avellaneda, A., Di Giorgio, C., Robin, M., De Clercq, E., Timon-David, P., & Galy, J. P. (2004). Synthesis and antileishmanial activity of (1,3-benzothiazol-2-yl) amino-9-(10H)-acridinone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 39(8), 685–690.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2004.04.006>

Dussault, I., & Forman, B. M. (2000). Prostaglandins and fatty acids regulate transcriptional signaling via the peroxisome proliferator activated receptor nuclear receptors. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 62(1), 1–13.

Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T., & Protter, A. A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(16), 11811–6.

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.02.043>

Fadok, V. a, Warner, M. L., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (1998). CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(11), 6250–6257.

Festa, C., Lauro, G., De Marino, S., D'Auria, M. V., Monti, M. C., Casapullo, A., ... Zampella, A. (2012). Plakilactones from the marine sponge *Plakinastrella mamillaris*. discovery of a new class of marine ligands of peroxisome proliferator-activated receptor ?? *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(19), 8303–

8317. <https://doi.org/10.1021/jm300911g>

Galès, A., Conduché, A., Bernad, J., Lefevre, L., Olagnier, D., Béraud, M., ... Pipy, B. (2010). PPAR γ controls dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, *6*(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000714>

Ganzer, U., & Jakupovic, J. (1990). Schkuhripinnatolides, unusual sesquiterpene lactones from *Schkuhria pinnata*. *Phytochemistry*, *29*(2), 535–539.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85113-T](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85113-T)

Gearing, K. L., Göttlicher, M., Teboul, M., Widmark, E., & Gustafsson, J. A. (1993). Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(4), 1440–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.4.1440>

Greenberg, M. E., Sun, M., Zhang, R., Febbraio, M., Silverstein, R., & Hazen, S. L. (2006). Oxidized phosphatidylserine–CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *203*(12), 2613–2625.
<https://doi.org/10.1084/jem.20060370>

Han, S., & Roman, J. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor γ : A novel target for cancer therapeutics? *Anti-Cancer Drugs*, *18*(3), 237–244. Retrieved from
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id>

=L46192975%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1097/CAD.0b013e328011e67d

Hellemans, J., Mortier, G., Paepe, A. De, Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007).

qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data, *8*(2).

<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>

Itoh, T., Fairall, L., Amin, K., Inaba, Y., Szanto, A., Balint, B. L., ... Schwabe, J. W.

R. (2008). Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids.

Nature Structural and Molecular Biology, *15*(9), 924–931.

<https://doi.org/10.1038/nsmb.1474>

Kell, D., & Dobson, P. (2008). Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical

drugs: an exception or t...: Discovery Service for Trinity College Dublin

(University), 7(march). Retrieved from

<http://eds.a.ebscohost.com.elib.tcd.ie/eds/pdfviewer/pdfviewer?sid=0a12e075-b1f3-4391-be0c-d5227960295e%40sessionmgr4006&vid=0&hid=4110>

Klotz, L. O. (2002). Oxidant-induced signaling: Effects of peroxynitrite and singlet

oxygen. *Biological Chemistry*, *383*(3–4), 443–456.

<https://doi.org/10.1515/BC.2002.047>

Kuby, J., Goldsby, R., Thomas, K., & Osborne, B. A. (2007). *Inmunología de Kuby*

(6ta ed.). McGraw-Hill Interamericana.

Le Lamer, A. C., Authier, H., Rouaud, I., Coste, A., Boustie, J., Pipy, B., & Gouault,

N. (2014). Protolichesterinic acid derivatives: α -Methylene- γ -lactones as potent

dual activators of PPAR γ and Nrf2 transcriptional factors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 24(16), 3819–3822.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.06.062>

Lefèvre, L., Galès, A., Olagnier, D., Bernad, J., Perez, L., Burcelin, R., ... Coste, A. (2010). PPAR γ ligands switched high fat diet-induced macrophage m2b polarization toward m2a thereby improving intestinal candida elimination. *PLoS ONE*, 5(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012828>

Lefèvre, L., Lugo-Villarino, G., Meunier, E., Valentin, A., Olagnier, D., Authier, H., ... Coste, A. (2013). The C-type Lectin Receptors Dectin-1, MR, and SIGNR3 Contribute Both Positively and Negatively to the Macrophage Response to *Leishmania infantum*. *Immunity*, 38(5), 1038–1049. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.010>

Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. a, Wilkison, W. O., Willson, T. M., & Kliewer, S. a. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *The Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.22.12953>

Lehrke, M., & Lazar, M. A. (2005). The many faces of PPAR γ . *Cell*, 123(6), 993–999. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.026>

Lemberger, T., Desvergne, B., & Wahli, W. (1996). Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 12, 335–363.

- León, A., Reyes, B. M., Chávez, M. I., Toscano, R. A., & Delgado, G. (2009). Sesquiterpene lactones, acyl phenyl propanoids and other constituents from *Schkuhria pinnata* var. *wislizeni*. antioxidant evaluation. *Journal of the Mexican Chemical Society*, *53*(3), 193–200.
- Lin, H. R. (2012). Sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* act as peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *22*(8), 2954–2958.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.02.043>
- McGreal, E. P., Miller, J. L., & Gordon, S. (2005). Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Current Opinion in Immunology*, *17*(1), 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.12.001>
- Mimche, P. N., Thompson, E., Taramelli, D., & Vivas, L. (2012). Curcumin enhances non-opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* through up-regulation of cd36 surface expression on monocytes/macrophages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(8), 1895–1904. <https://doi.org/10.1093/jac/dks132>
- Mokoka, T. A., Xolani, P. K., Zimmermann, S., Hata, Y., Adams, M., Kaiser, M., ... Fouche, G. (2013). Antiprotozoal screening of 60 South African plants, and the identification of the antitrypanosomal germacranolides schkuhrin I and II. *Planta Medica*, *79*(14), 1380–1384. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1350691>
- Mueller, M., & Jungbauer, A. (2009). Culinary plants, herbs and spices - A rich source of PPAR γ ligands. *Food Chemistry*, *117*(4), 660–667.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.063>

Muñoz, V., Sauvain, M., Bourdy, G., Arra, S., Callapa, J., Ruiz, G., ... Deharo, E. (2004). A search for natural bioactive compounds in bolivia through a multidisciplinary approach Part III. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Alteños indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2–3), 269–277.

Muthaura, C. N., Rukunga, G. M., Chhabra, S. C., Omar, S. A., Guantai, A. N., Gathirwa, J. W., ... Njagi, E. N. M. (2007). Antimalarial Activity of Some Plants Traditionally used in Meru district of Kenya. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 21, 860–867.

Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., ... Milburn, M. V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator- activated receptor- γ . *Nature*, 395(6698), 137–143.
<https://doi.org/10.1038/25931>

Olagnier, D., Lavergne, R. A., Meunier, E., Lefevre, L., Dardenne, C., Aubouy, A., ... Pipy, B. (2011). Nrf2, a ppar γ alternative pathway to promote cd36 expression on inflammatory macrophages: Implication for malaria. *PLoS Pathogens*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002254>

Osorio, F., & Reis e Sousa, C. (2011). Myeloid C-type Lectin Receptors in Pathogen Recognition and Host Defense. *Immunity*, 34(5), 651–664.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.001>

Oswald, I. P., Wynn, T. A., Sher, A., & James, S. L. (1992). Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor- α required as a costimulatory factor for interferon γ -induced activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(18), 8676–80.

<https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8676>

Pacciaroni, A. D. V., Sosa, V. E., Espinar, L. A., & Oberti, J. C. (1995).

Sesquiterpene lactones from *Schkuhria pinnata*. *Phytochemistry*, *39*(1), 127–131. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00914-F](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00914-F)

Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., ... Sacks, D. (2008). In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies, *321*, 972–974.

<https://doi.org/10.1126/science.1159194>

Pettei, M. J., Miura, I., Kubo, I., & Nakanichi, K. (1978). INSECT ANTIFEEDANT SESQUITERPENE LACTONES FROM SCHKUHRIA PINNATA: THE DIRECT OBTENTION OF PURE COMPOUNDS USING REVERSE- PHASE PREPARATIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY Michael. *Heterocycles*, *11*, 471–480.

Puhl, A. C., Bernardes, A., Silveira, R. L., Yuan, J., Campos, J. L. O., Saidemberg, D. M., ... Polikarpov, I. (2012). Mode of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activation by Luteolin. *Molecular Pharmacology*, *81*(6), 788–799.

<https://doi.org/10.1124/mol.111.076216>

- Rajaram, M. V. S., Brooks, M. N., Morris, J. D., Torrelles, J. B., Azad, A. K., & Schlesinger, L. S. (2010). Mycobacterium tuberculosis Activates Human Macrophage Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Linking Mannose Receptor Recognition to Regulation of Immune Responses. *The Journal of Immunology*, 185(2), 929–942. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000866>
- Ramírez-Cruz, F. J. M. (2010). *Efecto gastroprotector, diurético y sobre la motilidad intestinal del extracto etanólico de Schkuhria pinnata (Lamarck) Kuntze “Canchalagua” en ratas albinas*. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS.
- Reka, A. K., Kurapati, H., Narala, V. R., Bommer, G., Chen, J., Standiford, T. J., & Keshamouni, V. G. (2010). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Activation Inhibits Tumor Metastasis by Antagonizing Smad3-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(12), 3221–3232. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0570>
- Ribeiro-Gomes, F. L., Peters, N. C., Debrabant, A., & Sacks, D. L. (2012). Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathogens*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002536>
- Rocha, H., Carvalho, E. M., Almeida, R. P., Lessa, H., Filho, D. C., & Bacellar, O. (1995). Characterization of the Immune Response in Subjects with Self-Healing

Cutaneous Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53(3), 273–277. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.273>

Rojas M., W., Anaya C., J.-M., Aristizábal B., B. H., Cano R., L. E., Gómez O., L. M., & Lopera H., D. (2012). *Inmunología de Rojas*.

Russo, R., Laguna, F., López-Vélez, R., Medrano, F. J., Rosenthal, E., Cacopardo, B., & Nigro, L. (2003). Visceral leishmaniasis in those infected with HIV: clinical aspects and other opportunistic infections. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97(sup1), 99–105. <https://doi.org/10.1179/000349803225002570>

Sacks, D., & Kamhawi, S. (2001). MOLECULAR ASPECTS OF PARASITE-VECTOR AND VECTOR-HOST INTERACTIONS IN LEISHMANIASIS.

Sauvain, M., Dedet, J.-P., Kunesch, N., Poisson, J., Gantier, J.-C., Gayral, P., & Kunesch, G. (1993). In Vitro and In Vivo Leishmanicidal Activities of Natural and Synthetic Quinoids. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 7(1), 167–171.

Serghides, L., Patel, S. N., Ayi, K., Lu, Z., Gowda, D. C., Liles, W. C., & Kain, K. C. (2009). Rosiglitazone Modulates the Innate Immune Response to *Plasmodium falciparum* Infection and Improves Outcome in Experimental Cerebral Malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(10), 1536–1545. <https://doi.org/10.1086/598222>

Silvestre, R., Santarem, N., Tavares, J., Silva, A. M., & Cordeiro-da-Silva, A. (2009). Recognition of *Leishmania* Parasites by Innate Immunity. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents - Medicinal Chemistry (Formerly Current*

- Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*), 9, 106–127. <https://doi.org/10.2174/187152209789000713>
- Stahl, P. D., & Ezekowitz, R. a. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current Opinion in Immunology*, 10(1), 50–55. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80031-9](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80031-9)
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4), S1–S5. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>
- Underhill, D. M., Rossnagle, E., Lowell, C. a, Simmons, R. M., & Dc, W. (2011). Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production, 106(7), 2543–2550. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1239>
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., & Laskay, T. (2004). Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for Leishmania Entry into Macrophages. *The Journal of Immunology*, 173(11), 6521–6525. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6521>
- van Zandbergen, G., Solbach, W., & Laskay, T. (2007). Apoptosis driven infection. *Autoimmunity*, 40(4), 349–352. <https://doi.org/10.1080/08916930701356960>
- Vandesompele, J., Preter, K. De, Poppe, B., Roy, N. Van, & Paepe, A. De. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT -PCR data by geometric

averaging of multiple internal control genes, 1–12.

von Knethen, A., & Brune, B. (2002). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ by nitric oxide in monocytes/macrophages down-regulates p47^{phox} and attenuates the respiratory burst. *Journal of Immunology*, *169*, 2619–2626. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.5.2619>

Wang, L., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Blunder, M., Liu, X., Malainer, C., ... Atanasov, A. G. (2014). Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): A review. *Biochemical Pharmacology*, *92*(1), 73–89. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.018>

Weidner, C., de Groot, J. C., Prasad, A., Freiwald, A., Quedenau, C., Kliem, M., ... Sauer, S. (2012). Amorfrutins are potent antidiabetic dietary natural products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(19), 7257–7262. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116971109>

Willson, T. M., Brown, P. J., Sternbach, D. D., & Henke, B. R. (2000). [dissertação]The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, *43*(4), 527–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10691680>

Yki-Järvinen, H., D., M., & C.P., F. R. (2016). Thiazolidinediones. *The New England Journal of Medicine*, *27*(5), 743–751. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000438>

Yu, S., & Reddy, J. K. (2007). Transcription coactivators for peroxisome proliferator-

activated receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(8), 936–951. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.01.008>

Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A. G., El Hassan, I. M., & El-Hassan, A. M. (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases*, 3(2), 87–98. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00517-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00517-6)

Zou, G., Gao, Z., Wang, J., Zhang, Y., Ding, H., Huang, J., ... Shen, X. (2008). Deoxyelephantopin inhibits cancer cell proliferation and functions as a selective partial agonist against PPAR γ . *Biochemical Pharmacology*, 75(6), 1381–1392. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.11.021>

X. ANEXOS

10.1. ANEXO 1. Constancia 001-05-16 del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA).



**UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA**
Vicerrectorado de Investigación
Dirección Universitaria de Investigación,
Ciencia y Tecnología (DUICT)

CONSTANCIA 001 - 05 - 16

El Presidente del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética.

Título del Proyecto : "Inmunomodulación de macrófagos por dos compuestos aislados de *Schkuhria pinnata*, contra *Leishmania amazonensis*"

Código de inscripción : 66834

Investigadores : Matos Echevarría, Daniel Ernesto

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. **Protocolo de Investigación**, versión recibida en fecha 10 de enero del 2017.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **18 de enero del 2018**. Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 19 de enero del 2017.

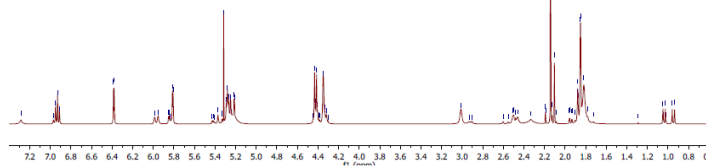
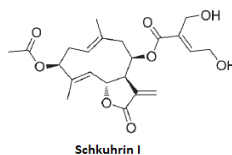
Dr. Carlos Espinoza Montes
Presidente

Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales

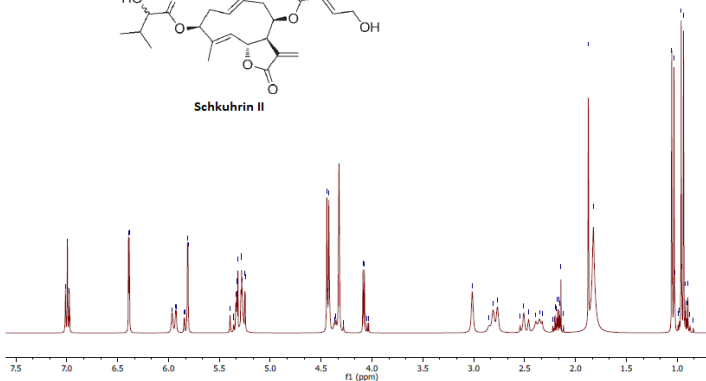
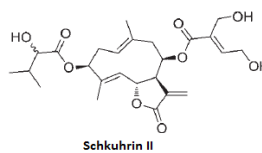
138

10.2. ANEXO 2. Espectros RMN y Masas de los compuestos schkuhrin I y schkuhrin II.

happad_m_20090300a.8_1013
passieur IRDORSE
1H - 1013.0



happad_m_20090300a.7.1.1r
passieur IRDORSE
1H - 1013.4



Señal	Datos del Compuesto	Datos de la Literatura
1	6.91 (t; J= 5.82; 1H)	6.91 (t; J= 5; 1H)
2	6.39 (d; J= 2; 1H)	6.36 (d; J= 3; 1H)
3	5.86 (d; J= 11; 1H)	5.95 (dd; J= 11, 3; 1H)
4	5.73 (d; J= 1.99; 1H)	5.76 (d; J= 2; 1H)
5	5.24 (t; J= 3.3; 1H)	5.23 (ddd; J= 3, 3, 1; 1H)
6	5.19 (dd; J= 10.9, 1.5; 1H)	5.23 (br ddq; J= 10, 7, 1.4; 1H)
7	5.19 (s; 1H)	5.23 (dd; J= 4, 3; 1H)
8	5.17 (s; 1H)	5.20 (dq; J= 11, 1.3; 1H)
9	4.35 (d; J= 5.84; 2H)	4.39 (d; J=5; 2H)
10	4.24 (s; 2H)	4.32 (s; 2H)
11	4.00 (d; J=4.27; 1H)	4.05 (d; J= 4.5; 1H)
12	-	3.35 (br;OH)
13	2.93 (s; 1H)	2.98 (dddd; J= 3, 3, 2, 1; 1H)
14	2.71 (dd; J= 14.4, 3.6, 2H)	2.78 (dd; J= 15, 3; 1H)
15		2.74 (ddd; J= 14, 10, 3; 1H)
16	2.40 (d; J= 14; 1H)	2.45 (dd; J= 15, 3; 1H)
17	2.27 (t; J= 7.4; 1H)	2.32 (ddd; J= 14, 7.4; 1H)
18	2.08 (dd; J= 6.9, 2.6; 1H)	2.20 (s; 1H)
19	0.96 (d; J= 6.91; 3H)	0.98 (t; J=7; 6H)
	0.87 (d; J= 6.8; 3H)	

(*)Señales correspondientes a SKII.

10.3. ANEXO 3. Absorbancias a 650 nm producidas por el formazán formado, para macrófagos estimulados con PMA ($M\phi + PMA$), con *L. amazonensis* en proporción 1:20 ($M\phi + P(1:20)$) y sin estímulo ($M\phi$). Se muestran los 4 grupos de macrófagos evaluados: sin tratamiento (S.T.) y tratados con rosiglitazona 5 μM (Rosi 5 μM), schkuhrin I 0.1 μM (SKI 0.1 μM) y schkuhrin II 0.1 μM (SKII 0.1 μM). Media \pm I.C. 95% de 3 experimentos independientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

